



Mise en forme par microstéréolithographie et frittage de céramiques macro-micro-poreuses en hydroxyapatite silicatée et évaluation biologique

Marie Lasgorceix

► To cite this version:

Marie Lasgorceix. Mise en forme par microstéréolithographie et frittage de céramiques macro-micro-poreuses en hydroxyapatite silicatée et évaluation biologique. Matériaux. Université de Limoges, 2014. Français. [⟨NNT : 2014LIMO4016⟩](#). [⟨tel-03890063⟩](#)

HAL Id: tel-03890063

<https://uphf.hal.science/tel-03890063v1>

Submitted on 8 Dec 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE Sciences et Ingénierie en Matériaux, Mécanique, Energétique et
Aéronautique (SI-MMEA)

FACULTE des Sciences et Techniques

Laboratoire Science des Procédés Céramiques et de Traitements de Surface

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline / Spécialité : Matériaux Céramiques et Traitements de Surface

présentée par

Marie LASGORCEIX

Soutenue le 17 juillet 2014

**Mise en forme par microstéréolithographie et frittage de céramiques
macro-micro-poreuses en hydroxyapatite silicatée et évaluation biologique**

Thèse dirigée par :

Eric CHAMPION, Roxana CHOTARD-GHODSNIA, Chantal DAMIA

JURY :

Rapporteurs :

Madame Karine ANSELME

Directeur de Recherche – Université de Haute Alsace

Madame Anne LERICHE

Professeur – Université de Valenciennes et du
Hainaut Cambresis

Examineurs :

Madame Christèle COMBES

Professeur – INPT, Toulouse

Monsieur David MARCHAT

Chargé de Recherche – ENSM, Saint-Etienne

Monsieur Thierry CHARTIER

Directeur de Recherche – Université de Limoges

Monsieur Eric CHAMPION

Professeur – Université de Limoges

Madame Chantal DAMIA

Maître de Conférences – Université de Limoges

Invité :

Monsieur Joël BRIE

Praticien Hospitalier – CHU, Limoges

REMERCIEMENTS

Ce travail de recherche a été mené au sein du laboratoire Science des Procédés Céramiques et de Traitements de Surface (SPCTS UMR 7315). Je tiens à remercier le Directeur, Thierry Chartier, pour m'avoir accueillie au sein de ce laboratoire.

Merci à Madame Karine Anselme et à Madame Anne Leriche d'avoir accepté de juger ce mémoire de thèse et de façon plus générale à tous les membres du jury, Madame Christèle Combes, Monsieur David Marchat et Monsieur Joël Brie, pour leurs remarques pertinentes qui ont été très précieuses lors de la finalisation de ce mémoire.

Lors de cette thèse, j'ai eu la chance de travailler aux côtés de personnes remarquables qui m'ont beaucoup appris. Mes premières pensées s'adressent à Roxana Chotard-Ghodsnia qui a su me donner goût à la recherche et qui est pour moi un très beau modèle de bonté, de force et de persévérance. Je ne saurais remercier mon directeur de thèse Eric Champion pour sa disponibilité, ses conseils avisés, sa patience et sa compréhension. Mes remerciements s'adressent également à Chantal Damia qui a toujours répondu présente lorsque j'avais besoin d'aide. Chantal, merci sincèrement pour ton soutien et tes nombreux conseils très judicieux !

Je souhaite exprimer ma sincère gratitude à mes référents pédagogiques, Pascal Tristant et Isabelle Julien, qui m'ont fait découvrir le monde de l'enseignement avec beaucoup d'enthousiasme. Merci également aux équipes pédagogiques de l'ENSIL et de la FST pour leur accueil. J'ai beaucoup apprécié de travailler dans ces environnements chaleureux.

Ce travail est le fruit de plusieurs collaborations (le laboratoire CBPF à Rio de Janeiro et le laboratoire EA3842 du CHU de Limoges). Je suis donc également reconnaissante envers toutes les personnes de ces laboratoires qui ont participé à ces travaux.

J'aimerais ensuite adresser mes remerciements à mes collègues du SPCTS. Tout d'abord, l'équipe biocéramiques. Merci à mes toutes premières collègues de bureau, Sabrina et Hiva, pour leur gentillesse, leur soutien et leurs conseils. Merci à Emeline pour son sourire, sa bonne humeur permanente et son aide précieuse. Merci à Aurélien pour son aide sur les synthèses, les pastilles, les carac... Merci également à tous les autres membres de l'équipe pour leur présence et les nombreuses discussions enrichissantes, Patricia, Marie-Michèle, Marylène, Karine, Nathalie et Younes. Merci aux stagiaires, Helene, Alex et Eddy, pour leur aide précieuse. Merci aussi à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à ces travaux. Urda et Amandine pour les études biologiques, Valérie pour l'AFM, Marina, Sandra et Mickaël pour les caractérisations des poudres, Marion pour les traitements thermiques, Solange pour les analyses thermiques, Etienne pour le réacteur et pour tout plein d'autres choses, Ariane et Pierre pour la microscopie, Richard pour la DRX, Julie pour la spectro (et pour tout le reste), Nadine pour tous les services administratifs (et les super circuits de rando), Nicolas et Simon pour la μ SL et le Labview (merci d'avoir sauvé la microstéréo !). Un grand merci également à tous ceux qui ont contribué à rendre cette expérience agréable et enrichissante par leur présence et leurs échanges : Cyril, Olivia, Xavier, JR, Fabien, Olivier, Jenny, Abid, Philippe, Antoine, Solène, LaUra, Laura, David, Matthieu, Laureline, Déborah, Aënor, Quitterie, ... Enfin, je tiens à décerner quelques mentions spéciales à ma super coloc Nastia pour tout ce qu'elle a pu m'apporter (les 200 et quelques pages du manuscrit ne suffiraient pas à tout détailler), à Anthony sans qui toutes ces longues journées passées au labo n'auraient pas été les mêmes, et à Florian pour son soutien et sa patience (qui a été mise à rude épreuve !).

SOMMAIRE

Introduction générale.....	1
Chapitre I – Etude bibliographique.....	5
I.1 Introduction	5
I.2 Hydroxyapatite et silicium	8
I.3 L’hydroxyapatite silicatée	12
I.4 Implants poreux.....	18
I.5 Mise en forme des implants poreux.....	54
I.6 Conclusion du chapitre I.....	69
Chapitre II – Matériau et mise en forme.....	71
II.1 Introduction	71
II.2 Synthèse et caractérisation des poudres HA et SiHA.....	71
II.3 Microstéréolithographie : principe et montage expérimental.....	78
II.4 Elaboration des suspensions photopolymérisables de SiHA.....	83
II.5 Elaboration d’échantillons SiHA macro-micro-poreux.....	113
II.6 Conclusion du chapitre II	141
Chapitre III – Evaluation biologique	143
III.1 Introduction	143
III.2 Adsorption de protéines à la surface des matériaux	145
III.3 Etude de biocompatibilité des substrats	158
III.4 Etude <i>in vivo</i>	169
III.5 Effet de la géométrie des macropores sur le comportement cellulaire.....	173
III.6 Etude préliminaire de l’effet de la géométrie des macropores sur la vascularisation	193
III.7 Conclusion du chapitre III.....	203
Conclusion générale et perspectives.....	207
Références bibliographiques	211
Annexes.....	233

Introduction générale

Le tissu osseux est en perpétuel renouvellement. Cependant, en cas de perte de substance osseuse trop importante ou de pathologies spécifiques, le processus naturel de remodelage osseux se révèle insuffisant ou inefficace. Un apport de matière, d'origine naturelle ou synthétique, devient alors nécessaire pour le comblement ou la restauration de défauts osseux. La partie minérale de l'os est assimilable à une apatite phosphocalcique polysubstituée, mal cristallisée et lacunaire. La composition du minéral osseux peut être décrite par la formule chimique simplifiée suivante [1] : $\text{Ca}_{8,3}(\text{PO}_4)_{4,3}(\text{CO}_3)_{1,0}(\text{HPO}_4)_{0,7}(\text{CO}_3,\text{OH})_{0,3}$. La similitude de composition entre la partie non organique de l'os et l'hydroxyapatite phosphocalcique synthétique (HA), de formule chimique $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, fait de ce matériau un candidat intéressant pour l'ingénierie tissulaire osseuse. L'HA est en effet très utilisée comme substitut osseux en raison, notamment, de sa biocompatibilité et de sa faculté à conduire la formation osseuse à sa surface. Une porosité ménagée dans cette biocéramique permet de favoriser la néoformation de tissus osseux qui vont recoloniser l'implant. Cependant, la bioactivité des implants poreux en hydroxyapatite est limitée. Une augmentation de leur bioactivité permettrait d'une part d'améliorer leur ostéointégration en préservant au mieux le capital osseux, et d'autre part d'élargir leurs utilisations au comblement de grandes pertes de substance osseuse ou à la réparation de grands défauts osseux, de volume supérieur à 1 cm^3 . L'enjeu actuel en ingénierie des tissus osseux réside donc dans la mise au point d'une nouvelle génération de biocéramiques aux performances accrues, ayant la faculté d'induire la formation osseuse sans être en contact avec de l'os existant.

La performance des biocéramiques phosphocalciques est susceptible d'être améliorée de trois façons. La première approche consiste à modifier la composition chimique du matériau, notamment en exploitant l'habilité de la structure apatitique à accepter les substitutions ioniques. En particulier, l'incorporation de silicium dans l'HA peut être intéressante, cet élément ayant été rapporté comme facteur potentiel de calcification osseuse. L'amélioration des performances des implants osseux passe également par un contrôle précis de l'architecture multiéchelle qui comprend la macroporosité et la microporosité. L'élaboration d'édifices à architecture poreuse complexe multiéchelle contrôlée requiert l'utilisation de techniques de mise en forme par prototypage à partir d'un modèle numérique

(CAD/CAM : *computer-aided Design/Manufacturing*) et une bonne maîtrise du frittage. Enfin, la formation osseuse peut être stimulée par ajout de biomolécules actives (protéines, peptides) et/ou de cellules. Cette fonctionnalisation des implants céramiques nécessite la compréhension préalable des phénomènes d'interaction matériau/biomolécules.

La présente étude s'inscrit dans ce contexte de développement d'implants en hydroxyapatite substituée, à architecture poreuse complexe multiéchelle contrôlée, et fonctionnalisés. Plus spécifiquement, ce mémoire porte sur le développement de suspensions photopolymérisables d'hydroxyapatite silicatée (SiHA) adaptées à un procédé de mise en forme de pièces complexes par microstéréolithographie (μ SL), la mise en forme de substrats macroporeux par cette technique et le frittage de ces substrats macro-micro-poreux. Une dernière partie de ce travail est consacrée à l'évaluation biologique du matériau SiHA, à l'influence de l'adsorption de protéines à la surface des matériaux HA et SiHA, sur leur conformation, et à l'étude de l'influence de la géométrie des macropores sur la réponse biologique.

Le premier chapitre de ce mémoire constitue une mise au point bibliographique définissant les orientations et la stratégie qui seront développées dans la partie expérimentale. Une première partie est focalisée sur l'intérêt biologique d'une substitution partielle du phosphate par le silicium dans l'HA et sur la synthèse et la stabilité thermique de SiHA. Le rôle de la porosité, à différentes échelles, des substituts osseux sur le comportement biologique est ensuite précisé. Enfin, sont présentées les différentes techniques de fabrication additive permettant la mise en forme d'implants osseux poreux à architecture contrôlée.

Le développement de suspensions photopolymérisables de SiHA et la détermination des paramètres du procédé de microstéréolithographie font l'objet d'un second chapitre. La synthèse et la caractérisation des poudres de SiHA sont décrites dans un premier temps. Une seconde partie est consacrée à la formulation de suspensions photopolymérisables de SiHA adaptées à ce procédé. Elle est suivie par l'étude des paramètres du procédé pour la mise en forme d'architectures poreuses contrôlées. Sur la base des résultats issus de cette étude, un modèle prédictif de dimensionnement des objets est proposé. Enfin, la dernière partie de ce second chapitre est consacrée à la maîtrise du taux de microporosité ouverte de substrats céramiques en SiHA mis en forme par μ SL, grâce à la modulation des paramètres de frittage.

Le troisième chapitre a pour objectif l'évaluation biologique des biocéramiques. Il traite de l'influence de l'adsorption d'une protéine, l'insuline, à la surface des matériaux HA et SiHA, sur sa conformation. Le comportement biologique de ces matériaux, avec ou sans adsorption de protéine, est ensuite évalué *in vitro* et *in vivo*. Enfin, des études préliminaires *in vitro* et *ex vivo* visent à préciser l'influence de la géométrie des macropores sur la colonisation cellulaire et sur la vascularisation d'implants modèles.

Chapitre I – Etude bibliographique

I.1 Introduction

L'ostéoconduction correspond à la croissance apparente de tissus osseux le long de la surface d'un implant lorsque ce dernier est placé en site osseux. En revanche, l'ostéoinduction peut être décrite comme l'habilité d'un implant à induire la formation osseuse lorsqu'il est implanté en site hétérotopique [2].

La greffe autologue demeure le standard de la substitution osseuse mais malgré leur ostéoconductivité et leur ostéoinductivité, les greffes osseuses autologues présentent de nombreux inconvénients. Elles sont souvent associées à une morbidité importante des prélèvements et à de nombreuses complications [3,4]. De plus, la présence d'un second site chirurgical peut être une source de douleur, parfois chronique, pour le patient [4,5]. Enfin, la quantité de greffons est limitée. Une solution à ces problèmes est de remplacer ce type de substituts par des implants synthétiques capables de combler des pertes de substance osseuse et de servir de support à une repousse osseuse.

Plusieurs familles de matériaux ont été envisagées pour la fabrication de substituts osseux [6–8] : les céramiques cristallines et les verres, les métaux, les polymères (naturels et synthétiques) [9] et les composites [10]. Parmi celles-ci, les céramiques offrent la possibilité de produire des implants à la fois biocompatibles et présentant une bonne rigidité et une bonne résistance mécanique.

Les biocéramiques peuvent être classées en deux grandes catégories selon leur bioactivité ou encore selon leur solubilité en milieu physiologique (Tableau 1). Les céramiques phosphocalciques sont réputées comme très bonnes candidates pour la substitution osseuse. Parmi celles-ci, les biocéramiques solubles telles que le phosphate tricalcique beta (β -TCP) sont généralement utilisées pour des comblements osseux temporaires de volumes peu importants et sont vouées à être remplacées intégralement et rapidement par des tissus vivants. En revanche, l'hydroxyapatite stoechiométrique peut être implantée dans l'organisme de façon durable. Sa faible solubilité en milieu physiologique lui

confère des champs d'application variés et en particulier la substitution osseuse en orthopédie ou encore la chirurgie reconstructive.

Catégorie	Solubilité en milieu physiologique	Matériaux les plus utilisés	Principaux domaines d'application
Inertes	Nulle	Alumine Alumine-zircone	• Odontologie (prothèses) • Orthopédie (prothèses articulaires, cales d'ostéotomie)
Bioactives	Faible	Hydroxyapatite Bioverres	• Odontologie (comblement, recouvrement) • Orthopédie (substitution osseuse, revêtement de prothèses, comblement, cales d'ostéotomie) • Oncologie (comblement) • Chirurgie reconstructive (crâno-faciale et otorhinolaryngologie)
	Elevée	Phosphate tricalcique beta	• Odontologie (comblement, recouvrement) • Orthopédie (comblement) • Oncologie (comblement)

Tableau 1 : Biocéramiques classées selon leur bioactivité et leur solubilité en milieu physiologique

Les phosphates de calcium, comme l'HA, le β -TCP ou encore les phosphates de calcium biphasés (BCP, mélanges d'HA et de TCP), sont particulièrement utilisés en ingénierie des tissus osseux [11]. Ces matériaux possèdent une composition chimique similaire à celle de la partie minérale de l'os, qui leur confère une excellente biocompatibilité. Ils sont ostéoconducteurs [12–15], ce qui permet à des implants poreux d'être recolonisés par des tissus osseux néoformés. De plus, la rigidité élevée et les bonnes propriétés mécaniques de ces céramiques permettent d'offrir une bonne stabilité de l'implant lors de la phase de recolonisation osseuse [16,17].

Les défis actuels de l'ingénierie tissulaire visent à développer des substituts osseux poreux de grande taille et/ou sur mesure permettant le comblement de pertes osseuses importantes ou la réparation de grands défauts osseux. Le processus naturel de remodelage osseux est limité et ne permet pas une colonisation complète de tels implants [18]. Le phénomène d'osteoinduction, associé à l'angiogénèse, est alors requis pour une repousse osseuse au sein de grands volumes. Les implants osseux couramment utilisés, constitués généralement d'hydroxyapatite, ne présentent pas ce caractère osteoinducteur. Le développement de substituts synthétiques de grande taille passe donc par une amélioration de la bioactivité des implants. Cette dernière dépend d'une part de leur composition chimique et d'autre part de leurs propriétés macrostructurales et microstructurales [19]. La bioactivité des

implants peut être améliorée de différentes façons (Figure 1) : par la modification des propriétés chimiques des matériaux [2], par la modification des propriétés structurales des implants [2] et/ou par l'ajout de facteurs biologiques [20].

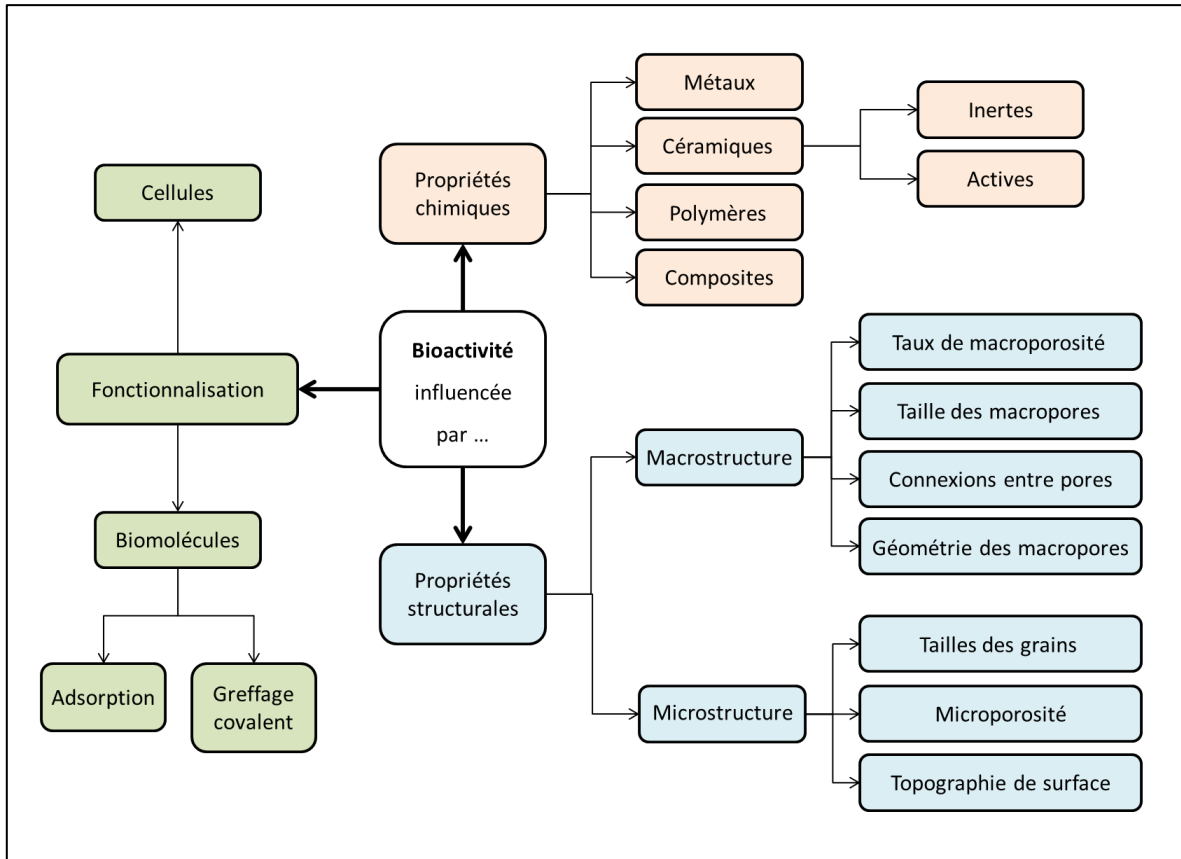


Figure 1 : Schéma résumant les paramètres influençant la bioactivité des implants osseux

La présente étude est principalement focalisée sur les aspects liés aux propriétés chimiques et structurales des implants. La première partie de cette synthèse bibliographique porte sur l'intérêt biologique du silicium et de son incorporation dans l'HA. La seconde partie est focalisée sur le rôle de la porosité et de ses caractéristiques, sur les propriétés biologiques des substituts osseux. Dans la dernière partie sont décrites les différentes techniques de fabrication additive permettant la mise en forme d'implants poreux à architecture contrôlée.

I.2 Hydroxyapatite et silicium

I.2.1 L'hydroxyapatite

Les apatites sont des composés isomorphes possédant une structure cristalline hexagonale. Leur formule générique est $\text{Me}_{10}(\text{XO}_4)_6(\text{Y})_2$, où Me représente généralement un cation divalent, XO_4 un groupement anionique trivalent et Y un anion ou un groupement ionique monovalent. L'hydroxyapatite phosphocalcique (HA) de formule chimique $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, appartient à cette famille cristallographique. Sa structure apatitique lui confère la possibilité d'accueillir différents ions sur chacun de ses sites. La faculté de substitution de ce matériau peut être exploitée afin d'en modifier la réponse biologique [21]. Il peut être intéressant, en particulier, d'introduire dans la structure de l'HA des éléments présents dans la phase minérale de l'os, comme le magnésium [22], le zinc [23], le strontium [24], le sodium [25], le fluor [26], le carbone [27], ou encore le silicium.

I.2.2 Intérêt biologique du silicium

A raison d'une consommation journalière de 20 à 50 mg [28,29], le silicium est un élément trace de notre alimentation. Il a pu être localisé, *in vivo*, dans les tissus osseux, dans les composants de la matrice extracellulaire (MEC) et sur les sites actifs de calcification [30,31]. L'élément silicium a ainsi été rapporté dès 1970, par Carlisle, comme un facteur possible de calcification osseuse [30]. Puis, l'étude menée par Schwarz *et al.* en 1972 [32], montrant une croissance *in vivo* sur des rats favorisée par un apport nutritif important en silicium, a permis de mettre en évidence l'implication de cet élément dans le processus de développement de ces animaux. Depuis cette date, l'effet du silicium sur le métabolisme osseux retient l'attention de plusieurs équipes de recherche. Les principaux résultats de ces études sont résumés dans le Tableau 2.

De nombreuses études, menées *in vivo*, ont pu confirmer l'effet positif du silicium sur le métabolisme osseux. En particulier, l'effet néfaste d'une carence en silicium sur le

développement squelettique et cartilagineux a été mis en évidence par des travaux de Carlisle [33,34]. De plus, des corrélations ont pu être établies entre la consommation en silicium et un effet bénéfique sur la densité minérale osseuse [35,36], ainsi que sur la concentration de collagène dans l'os [37–39].

Afin de mieux cibler le rôle du silicium sur le métabolisme osseux, d'autres études ont été réalisées *in vitro*, par ajout de silicium au sein des milieux de culture de cellules de lignée ostéoblastique. Ces travaux ont permis de révéler l'influence positive du silicium sur la prolifération et la différenciation des ostéoblastes, sur leur activité de minéralisation ainsi que sur la synthèse de collagène de type 1 [40–43].

Enfin, afin de mieux comprendre l'éventuel effet du silicium sur le processus de minéralisation osseuse, des études se sont focalisées sur le phénomène de précipitation d'HA, en milieu aqueux, en présence ou non de silicium [44,45]. En particulier, lors de l'étude réalisée par Tanizawa *et al.* [44], en milieu aqueux contenant des ions calcium et phosphate, la présence d'ions silicates a permis d'améliorer la précipitation de précurseurs d'HA (le phosphate de calcium amorphe et le phosphate dicalcique dihydraté). La présence d'ions silicates a cependant également engendré une inhibition de la transformation de ces précurseurs d'HA en raison d'un dépôt de silicate à leur surface à un stade précoce du processus de précipitation. En revanche, la présence de silice dans ces solutions aqueuses a permis de fournir des sites favorables à la nucléation de ces précurseurs.

Par conséquent, l'effet biologique du silicium se révèle être multiple et son impact sur le métabolisme osseux semble dépendre de la forme dans laquelle se trouve cet élément.

Localisation du silicium (Si)	Réf	Démarche	Observations/résultats	Conclusions
Naturellement présent dans les tissus (<i>in vivo</i>)	Carlisle <i>et al.</i> [30]	Analyse d'os de jeunes rats et souris par microsonde électronique	– Si localisé sur les sites actifs de calcification – Taux de Si plus élevé dans les 1^{ers} stades de calcification (Ca/P = 0,7) que dans le cas d'une minéralisation très avancée (Ca/P = 1,67)	Si → impliqué dans les premiers stades du processus de biominéralisation
	Schwarz <i>et al.</i> [31]	Détermination du taux et de la nature du Si présent (libre ou lié)	Forte concentration de Si dans les composants de la MEC	Si → agent de réticulation biologique qui contribue à l'architecture et à la résistance du tissu conjonctif
Administration <i>in vivo</i> (Apport et/ou carence)	Schwarz <i>et al.</i> [32]	Suivi de la croissance de rats (poids total) bénéficiant ou non d'un apport alimentaire élevé en Si (50 mg/100g)	Gain de poids plus rapide chez les rats supplémentés en Si	Si → élément essentiel pour la croissance
	Carlisle <i>et al.</i> [33]	Observation du développement de poussins subissant une carence en Si, ou bénéficiant d'un apport alimentaire élevé en Si	Développement squelettique moins important des poussins défavorisés en Si que des poussins supplémentés en Si (os des pattes plus petits, cortex plus mince, os métatarsiens plus flexibles, fémur et tibia plus facilement fracturables, os crâniens plus plats)	Si → impliqué à un stade précoce de la formation osseuse et essentiel à la croissance normale
	Carlisle <i>et al.</i> [34]	Observation du développement squelettique de poussins subissant une carence en Si, ou bénéficiant d'un apport alimentaire élevé en Si	Troubles des séquences du cartilage épiphysaire résultant d'une croissance osseuse ondochondrale défectueuse, pour les poussins déficitaires en Si	Si → impliqué dans la chaîne métabolique d'événements nécessaires aux séquences de cartilage épiphysaires, elles-mêmes essentielles à la croissance normale de l'os
	Eisinger <i>et al.</i> [35]	Analyse de la densité minérale osseuse de femmes ostéoporotiques avant et après traitement à base de Si	Augmentation significative de la densité minérale osseuse après traitement à base de Si	Si → effet bénéfique du sur la densité minérale osseuse
	Hott <i>et al.</i> [39]	Analyse de l'os trabéculaire de rats bénéficiant ou non d'un apport en silanol (0,1 ou 1,0 mg/kg/j)	Diminution de la résorption et augmentation de la formation osseuse, avec l'apport en silanol	Si (du silanol) → effet stimulant sur la formation et/ou sur la stabilité de la matrice organique de l'os
	Calomme <i>et al.</i> [37]	Analyse, chez le veau, de la concentration de Si dans le sérum sanguin et de la concentration en collagène dans le cartilage, avant et après apport d'acide orthosilicique	Corrélation positive entre la concentration en Si du sérum, la concentration de collagène dans le cartilage et la concentration en Ca et P du sérum	Si → impliqué dans la formation de composants de la MEC et dans le métabolisme de Ca
	Seaborn <i>et al.</i> [38]	Analyse d'hydroxyproline de fémurs de jeunes rats ayant reçu une forte dose ou une dose nulle de métasilicate de sodium	– Un déficit en Si diminue la concentration de collagène dans l'os – Taux d'hydroxyproline significativement plus faible pour les rats privés de Si	Si → élément nutritif dans le processus de formation osseuse
	Jugdohsin gh <i>et al.</i> [36]	Analyse du rapport entre la consommation de Si et la densité minérale osseuse sur la hanche et la colonne vertébrale d'hommes et de femmes	Corrélation positive établie entre la consommation de Si et la densité minérale osseuse sur la hanche	Si (alimentation riche) → effets bénéfiques sur la santé du squelette (os cortical)

Milieu de culture (<i>in vitro</i>)	Keeting <i>et al.</i> [40]	Culture de cellules ostéoblastes en présence de zéolithe	– Augmentation de la synthèse d'ADN et du taux de cellules en mitose, en présence de zéolithe – Augmentation significative de l'activité de la phosphatase alcaline et de l'ostéocalcine, en présence de zéolithe	Si (dans zéolithe) → induction de la prolifération et de la différenciation de cellules de lignée ostéoblastique
	Reffitt <i>et al.</i> [42]	Traitement de cellules de lignée ostéoblastique avec de l'acide orthosilicique. Etude de l'effet de l'acide orthosilicique sur la synthèse de collagène de type 1, la phosphatase alcaline et l'ostéocalcine	– Synthèse accrue de collagène – Augmentation significative de l'activité de la phosphatase alcaline et de l'ostéocalcine – Augmentation significative l'expression des gènes de la phosphatase alcaline et de l'ostéocalcine	Si (dans acide orthosilicique) → stimulation de la synthèse de collagène de type 1 sur les cellules ostéoblastes et stimulation de la différenciation ostéoblastique
	Arumugam -2006 [41]	Etude de l'effet de la concentration de l'acide orthosilicique sur l'expression des gènes d'ostéoblastes	Augmentation de l'expression des gènes de collagène de type 1 avec l'ajout d'acide orthosilicique	Si (dans acide orthosilicique) → stimulation de l'expression des gènes de collagène de type 1
	Kim <i>et al.</i> [43]	Traitement d'ostéoblastes matures avec différentes doses de metasilicate de sodium	Augmentation de la formation de nodules minéralisés, en présence du metasilicate de sodium	Si → renforcement de l'activité de minéralisation des ostéoblastes
Matériau (milieu acellulaire)	Damen <i>et al.</i> [45]	Mesure du temps d'induction de précipitation spontanée d'HA à partir de solutions aqueuses sursaturées en Ca et P, en présence ou non de macromolécules connues pour inhiber sa précipitation	– Accélération de la précipitation spontanée d'HA, en présence de silice – Stimulation, en présence de Silice, de la précipitation d'HA malgré la présence d'une bactérie inhibitrice – Inhibition, par du pyrophosphate, de la précipitation d'HA, non compensée par la présence de silice	Si → impliqué dans le processus de minéralisation
	Tanizawa <i>et al.</i> [44]	Suivi de la précipitation d'HA en solution aqueuse contenant des ions Ca et P, en présence d'ions silicates puis de silice	– Amélioration de la précipitation de précurseurs d'HA, en présence d'ions silicates – Inhibition, en présence d'ions silicates, de la transformation des précurseurs d'HA car formation de silicate à la surface des précurseurs à un stade précoce du processus de calcification – Sites favorables à la nucléation des précurseurs, fournis par la silice	Si → facteur possible de minéralisation selon la forme dans laquelle il se trouve

Tableau 2 : Etudes de l'effet du silicium sur le métabolisme osseux

I.3 L'hydroxyapatite silicatée

I.3.1 Modèle structural

Le modèle généralement retenu pour décrire l'incorporation du silicium dans l'hydroxyapatite est celui proposé en 1999 par Gibson *et al.* [46]. Il implique la substitution d'un groupement phosphate PO_4^{3-} par un groupement silicate SiO_4^{4-} , avec la création de lacunes sur le site hydroxyde, en respect de l'électroneutralité du composé, soit la formule chimique $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{SiO}_4)_x(\text{OH})_{2-x} \square_x$ (avec $0 \leq x \leq 2$, $\square$ représente une lacune). Selon ce modèle, la teneur massique maximum théorique de silicium pouvant être introduite dans la maille apatitique est de 5,82 %, ce qui correspond à 2 moles de silicate. De nombreuses compositions ont été étudiées, avec des valeurs de taux de substitutions massiques observées dans la littérature variant de 0,1 % à 5 % [47]. Le taux de substitution semble avoir un impact sur la réponse biologique de ce matériau. Toutefois, le comportement biologique de SiHA demeure assez mal connu et fait actuellement l'objet d'études. Le paragraphe suivant est consacré aux résultats de ces différents travaux et aux discussions et questionnements qui en découlent.

I.3.2 Comportement biologique des hydroxyapatites silicatées

Comme précisé dans le paragraphe I.2.2, l'effet biologique du silicium semble dépendre de la forme dans laquelle il se trouve. L'action du silicium dépend également de la façon dont il est introduit dans l'organisme. Lorsqu'il est incorporé au sein de la structure apatitique, son effet biologique n'est pas clairement connu. De nombreuses études expérimentales ont été menées pour comprendre son implication. Différents auteurs ont rapporté la biocompatibilité [48] et les performances biologiques de SiHA, par étude *in vitro* de prolifération et différenciation cellulaires [49,50] et par observation de croissance osseuse et de recouvrement os/implant *in vivo* [51–53]. Les hypothèses proposées pour expliquer le rôle effectif du silicium, en substitution, sur la réponse biologique, sont décrites dans la suite de ce paragraphe.

L'effet biologique positif des SiHA est supposé provenir de la libération de silicium lors de la dégradation des implants dans l'organisme. Cette dégradation est due au phénomène

chimique de dissolution, qui peut être étudié en milieu acellulaire, et au phénomène biologique de résorption qui ne peut être évalué qu'*in vivo*.

Des études menées en milieu acellulaire, par immersion dans des solutions SBF (*simulated body fluid*), ont permis de mettre en évidence un accroissement de la solubilité de l'HA lors de l'incorporation du silicium dans sa structure et une reprécipitation plus importante et plus rapide d'hydroxyapatite biologique dans le cas de SiHA que dans le cas d'HA pure [54–57]. La présence du silicium au sein de la maille apatitique est donc supposée favoriser le phénomène de dissolution-reprécipitation.

Guth *et al.* [58], ont étudié la libération de silicium à partir de SiHA dans un milieu de culture et évalué l'effet de sa libération sur l'activité de la phosphatase alcaline et sur l'expression du collagène de type I par des cellules ostéoblastes. Les résultats ont indiqué que le silicium pouvait quitter la structure cristalline de SiHA et pouvait également reprécipiter sur le substrat. Cette étude a également montré que le silicium pouvait influencer le métabolisme et la différenciation des ostéoblastes, qu'il soit sous forme libre ou lié au réseau cristallin de l'apatite.

Certains auteurs, lors de travaux réalisés *in vivo*, ont rapporté une formation osseuse plus importante et plus rapide dans le cas de SiHA que dans le cas d'HA [51,59]. Ce comportement peut s'expliquer par une dégradation *in vivo* plus importante de SiHA que HA. Une étude *in vivo* menée par Porter *et al.* [60], sur des SiHA, a montré une dissolution prédominante aux joints de grains alors que cette dissolution se localise préférentiellement en surface des grains lors de l'étude dans le SBF. L'augmentation de la dissolution de l'hydroxyapatite pourrait s'expliquer par la réduction de la taille des grains, engendrée par l'incorporation du silicium dans la structure apatitique. Il s'agirait donc d'un effet indirect du silicium qui provoque des modifications microstructurales du matériau [48,61,62], avec en particulier une modification de la topographie de surface et une réduction de la taille des grains. Or, comme il sera développé en détail dans le paragraphe I.4.3, ces paramètres microstructuraux ont été rapportés pour avoir une influence significative sur la bioactivité des implants.

Au final, la libération du silicium dans l'organisme pourrait avoir un effet direct sur le métabolisme cellulaire, comme il a été précisé au paragraphe I.2.2. Néanmoins, peu de

travaux se sont portés sur la quantification de la dégradation de ces matériaux ou sur la cinétique de libération du silicium. Il est donc difficile d'attester avec certitude un lien direct entre les performances biologiques accrues des implants substitués au silicium avec la libération de cet élément dans l'organisme.

L'hypothèse du relargage du silicium lors de la dégradation des céramiques en SiHA dans l'organisme est remise en question [63]. En effet, les réductions de tailles de grains observées jusqu'ici ne permettraient pas à elles seules une augmentation significative de la dégradation des apatites, la solubilité et la résorbabilité de l'hydroxyapatite demeurant extrêmement faibles [64].

Récemment, une autre hypothèse a été évoquée pour expliquer la solubilité élevée observée sur des céramiques en SiHA. Elle pourrait être due à la présence de silicium sous forme de composés solubles [63]. Ainsi, le silicium présent dans ces matériaux ne serait pas inclus dans la maille apatitique ou n'y serait incorporé que partiellement [54,55]. En particulier, Gasquères *et al.* [65] ont montré, par analyse spectroscopique RMN du solide d'hydroxyapatites silicatées, que seule une partie des atomes de silicium était incorporée dans la maille apatitique, le reste étant situé en dehors de la structure sous forme de gel de silice. De plus, l'augmentation de la solubilité et/ou de la résorbabilité de SiHA par rapport à HA pourrait être attribuée à la présence de phases secondaires contenant du silicium telles que le TCP. En effet, la résorbabilité totale de composés de type phosphate tricalcique silicaté a pu être mise en évidence *in vivo* [66].

Malgré les nombreux doutes qui demeurent quant au rôle précis du silicium sur la bioactivité des implants et à son mode d'action lorsqu'il est incorporé dans la structure apatitique, la biocompatibilité des céramiques en SiHA a pu être prouvée lors de nombreuses études *in vitro* et *in vivo*, ce qui en fait un matériau viable pour la substitution osseuse.

En outre, le comportement biologique des SiHA dépend du taux de silicium réellement incorporé dans la maille apatitique. Certains auteurs ont proposé une valeur de 0,8 % massique comme taux optimal, en terme de bioactivité, en comparaison à des taux de 0,2 %, 0,4 %, et 1,5 % [50,52,67]. En revanche, l'étude menée par Thian *et al.* [68], comparant des taux de 0,8 %, 2,2 % et 4,9 %, a conduit à un optimum de 2,2 % massique. Les taux de substitution pouvant présenter un intérêt biologique semblent donc se situer dans cet intervalle

de 0,8 à 2,2 % massique. Là encore, les différents résultats biologiques observés lors de ces études peuvent être dus au taux de substitution mais peuvent être également influencés par la pureté des composés étudiés. En effet, comme il sera précisé dans le paragraphe I.3.3, il est difficile d'obtenir des céramiques SiHA monophasées pour des taux de substitution élevés, ce qui conduit à nuancer les conclusions de ces différents travaux.

Par ailleurs, comme il a été mentionné au paragraphe I.1 (Figure 1, p 8), un moyen d'accroître la bioactivité des implants est de fonctionnaliser leur surface avec des biomolécules actives. En particulier, le greffage covalent de biomolécules à la surface de l'HA peut faire appel à une étape de silanisation qui consiste à former des liaisons covalentes Si-O-Si entre des organo-alkoxysilanes et les groupements hydroxyde présents à la surface d'HA [69]. Ces liaisons Si-O-Si constituent des groupements fonctionnels favorables au greffage de biomolécules permettant la fonctionnalisation du matériau [70]. L'incorporation de groupements silicates dans la structure apatitique engendre la formation de terminaisons Si-OH, à la surface du matériau, qui peuvent constituer des sites d'accueil favorables aux organo-alkoxysilanes. Cet aspect constitue un critère supplémentaire en faveur de l'incorporation du silicium dans l'HA.

Pour conclure, la biocompatibilité, la bioactivité et la faculté de fonctionnalisation de SiHA en font un matériau d'intérêt pour la substitution osseuse. C'est pourquoi, la synthèse et la stabilité thermique de ce matériau ont attiré l'attention de plusieurs équipes de recherche. Ces études font l'objet du paragraphe suivant.

I.3.3 Synthèse et stabilité thermique de l'hydroxyapatite silicatée

Les méthodes de synthèse de SiHA rencontrées dans la littérature sont les suivantes :

- Le procédé sol gel
- La réaction en phase solide
- La méthode hydrothermale (et solvothermale)
- La précipitation en voie aqueuse

Le procédé sol gel semble conduire systématiquement à la formation de composés secondaires [71]. La synthèse par réaction solide à haute température, quant à elle, peut conduire à des oxy-hydroxyapatites silicatées monophasées [72], ou nécessite l'incorporation d'un ion secondaire tel que le lanthane ou le sulfate [73].

Les méthodes les plus répandues sont la synthèse hydrothermale [44,56,74–76] et la précipitation en voie aqueuse [46,55,62,77–81]. Elles permettent toutes deux la formation d'une phase cristallisée unique de structure apatitique. Parmi celles-ci, la synthèse par précipitation en voie aqueuse est la méthode la plus utilisée. Cette dernière a fait l'objet de nombreuses études, ce qui en fait un procédé relativement bien maîtrisé permettant l'obtention de composés monophasés de structure apatitique.

En général, la précipitation en voie aqueuse ne permet pas la formation directe d'hydroxyapatite silicatée. Des travaux antérieurs, effectués au laboratoire SPCTS [82], ont montré que les poudres brutes obtenues par cette méthode de synthèse, à partir de tétraacétate de silicium, sont des apatites carbonatées de type B (substitution d'ions phosphates par des ions carbonates) contenant une partie des silicates au sein de leur structure. Une phase secondaire contenant l'excès de silicates est également présente. Un traitement thermique, au-dessus de 700°C, est alors nécessaire pour incorporer le silicium de la phase secondaire dans la structure apatitique, à la place des carbonates situés en sites B, selon le mécanisme réactionnel proposé par Palard *et al.* [82] (Équation 1). Il est possible, par cette méthode, d'obtenir des poudres d'hydroxyapatite silicatée monophasée pour des teneurs en silicium inférieures à une mole [82]. En revanche, les taux de substitution plus élevés conduisent à des systèmes biphasés.



Équation 1 : Mécanisme d'incorporation des silicates dans la structure apatitique proposé par Palard et al. [82], lors d'un traitement thermique à partir de 700°C

Une autre approche permet l'obtention directe de poudres brutes SiHA par précipitation en voie aqueuse, en remplaçant le précurseur tétraacétate de silicium par une solution de silicates solubles préparée par voie sol-gel à partir de tétraéthylorthosilicate [78].

La stabilité thermique des hydroxyapatites substituées se trouve affectée par la présence du silicium au sein de leur structure. Il provoque un abaissement de la température de décomposition thermique. De plus, cet effet croît avec le taux de silicium incorporé (Figure 2-a). L'analyse, par diffraction des rayons X, de poudres d'hydroxyapatites silicatées calcinées à haute température, réalisée par Palard *et al.* [77], a permis de mettre en évidence les produits de décomposition suivants : l'hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, le phosphate tricalcique alpha $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-}\alpha$, le silicate de calcium Ca_2SiO_4 et la silicocarnotite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_4(\text{SiO}_4)_2$.

Le frittage naturel des hydroxyapatites est également influencé par la présence du silicium et ce phénomène dépend du taux de silicium [61]. Le taux maximum de silicium incorporable dans la maille apatitique, sans formation de phase secondaire, diffère selon la méthode de synthèse adoptée et les traitements thermiques appliqués (température, temps). Le silicium engendre un décalage des températures de début de frittage vers des valeurs plus élevées. La vitesse de frittage maximale est également détectée à des températures plus élevées dans le cas de la substitution au silicium par rapport à des hydroxyapatites pures [83]. L'obtention de taux de densification élevés pour des hydroxyapatites silicatées requiert donc des températures de frittage d'autant plus élevées que la teneur en silicium augmente (Figure 2-a). Selon les travaux réalisés par Palard *et al.* [48], un choix judicieux des paramètres de frittage permet l'obtention de composés monophasés avec des taux de densification supérieurs à 95 % de la densité théorique, pour des teneurs en silicium inférieures à 0,6 mole. Les matériaux ainsi obtenus partagent le même groupe cristallographique que les hydroxyapatites pures, avec cependant des modifications de paramètres de maille engendrées par l'incorporation du silicium dans la maille apatitique [46,77,80]. En revanche, la densification d'hydroxyapatites silicatées, possédant des taux de silicium plus élevés, nécessite une élévation importante de la température de frittage, conduisant à la décomposition de la phase apatitique. Il est donc impossible, dans ces conditions, d'obtenir des hydroxyapatites silicatées denses et monophasées, par frittage naturel, pour des teneurs en silicium supérieures à 0,6 mole (Figure 2-b).

Par conséquent, selon les résultats relevés dans la littérature [83], il s'avère expérimentalement difficile d'obtenir des céramiques SiHA denses cristallisées et monophasées pour des taux de substitution élevés, c'est-à-dire pour des teneurs en silicium supérieures à 0,5 mole.

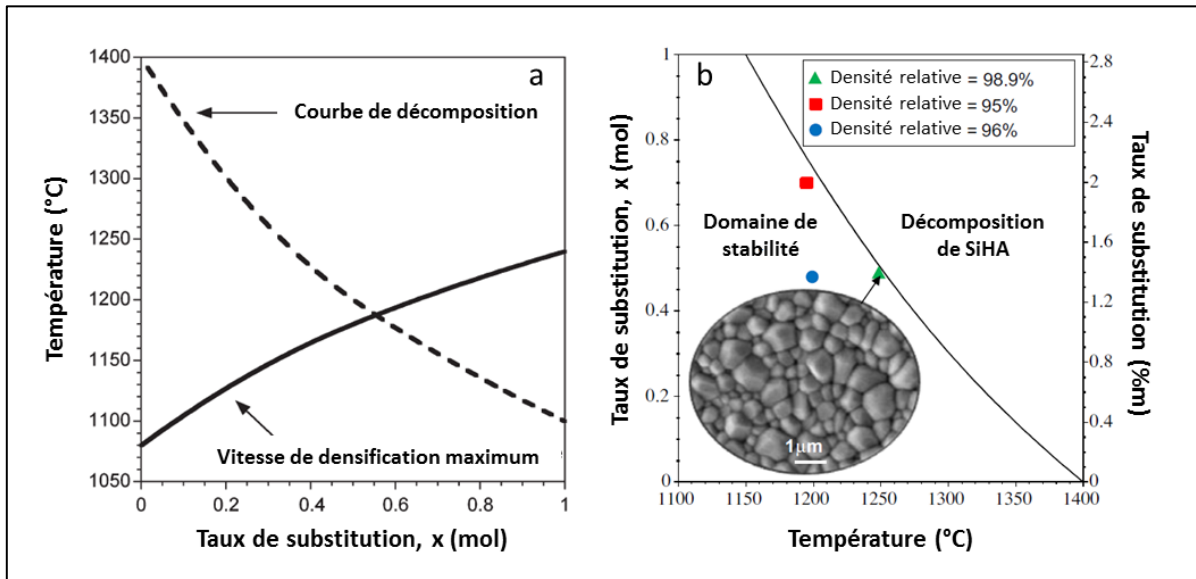


Figure 2 : (a) Courbes de décomposition thermique et de vitesse de densification maximum des SiHA selon les taux de substitution [48] ; (b) Données expérimentales de densification de SiHA monophasées issues de la littérature [83]

I.4 Implants poreux

La recolonisation osseuse est recherchée par l'implantation de substituts macroporeux dont les performances peuvent être accrues par la maîtrise des paramètres macro et microstructuraux (Figure 1).

La porosité des implants peut être décrite par :

- Le taux de porosité (ou volume de porosité) ;
- La taille moyenne des pores ;
- La distribution en taille des pores ;
- La géométrie des pores ;
- Les interconnexions entre pores.

Selon la terminologie de l'IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) [84,85], les macropores sont définis comme des pores possédant une taille supérieure à 50 nm, les mésopores ont une taille comprise entre 2 nm et 50 nm et les

micropores, une taille inférieure à 2 nm. Dans la présente étude, ce vocabulaire est conforme à celui habituellement rencontré dans la littérature pour décrire les tailles de pores des édifices poreux utilisés en substitution osseuse. Les « macropores » désignent alors des pores possédant un diamètre moyen de quelques dizaines ou quelques centaines de micromètres et le terme « micropore » est utilisé dans le cas des pores dont le diamètre moyen est inférieur à 10 micromètres (Figure 3, Figure 4).

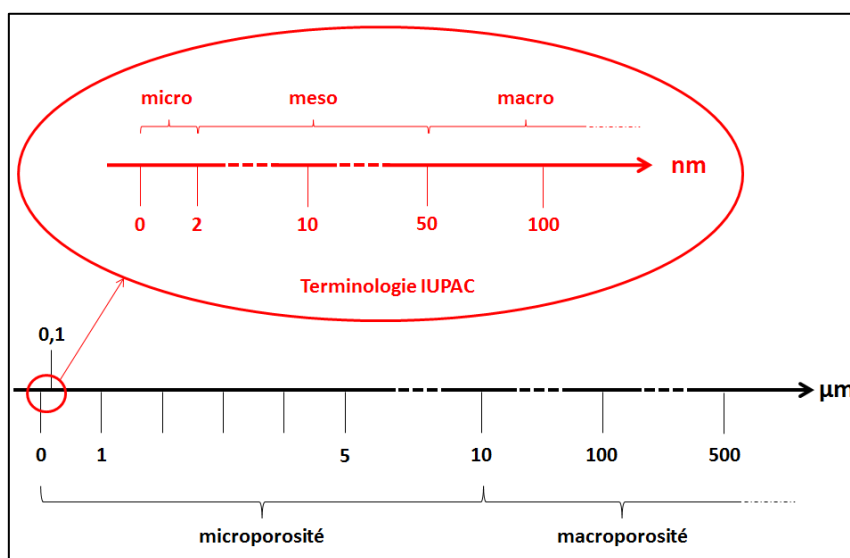


Figure 3 : Echelle linéaire de tailles de porosité utilisée pour décrire les implants poreux

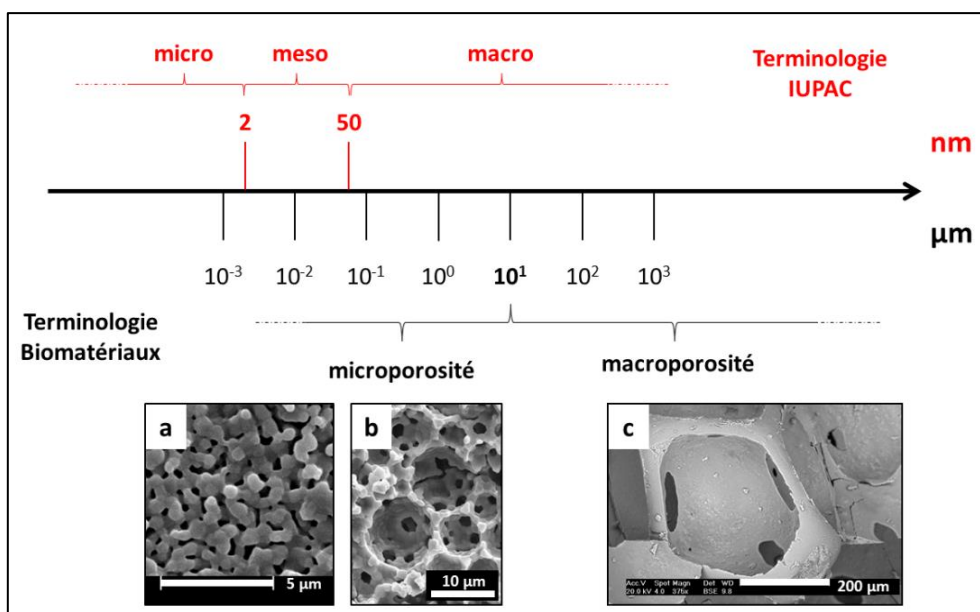


Figure 4 : Echelle logarithmique de tailles de porosité utilisée pour décrire les implants poreux ; (a) micrographie MEB de substrat de SiHA microporeux issue de la présente étude, (b) micrographie MEB de substrat d'HA microporeux [86] et (c) micrographie MEB de substrat de TCP macroporeux [87]

Dans la suite de ce paragraphe, l'influence des paramètres macro-micro-structuraux est essentiellement discutée sur la base des biomatériaux de type phosphate de calcium. D'autres matériaux sont présentés ponctuellement pour illustrer le propos sur l'intérêt particulier d'un paramètre structural spécifique.

I.4.1 Caractérisation de la porosité

La porosité peut être évaluée à l'aide de différentes méthodes. Chacune d'elle est adaptée à un type de porosité (totale, notée Π ; ouverte, notée π ; ou fermée, notée δ) et à un intervalle de taille de pores. Les techniques de caractérisation couramment rencontrées dans la littérature pour l'évaluation de la porosité et de la taille des pores sont décrites ci-dessous (P1050¹).

¹ Techniques de l'Ingénieur P1050 : Caractérisation de la texture poreuse des matériaux

♦ La porosité totale Π est définie comme le rapport entre le volume des pores V_{pores} et le volume total de l'échantillon V_{total} , qui est la somme du volume de pores et du volume de matière dense $V_{matière}$ (Équation 2).

$$\Pi = \frac{V_{pores}}{V_{total}} = \frac{V_{pores}}{V_{pores} + V_{matière}}$$

Équation 2 : Calcul de la porosité totale Π (V_{pores} : volume des pores ; V_{total} : volume total de l'échantillon ; $V_{matière}$: volume de matière dense)

La porosité totale Π peut être évaluée par gravimétrie selon l'Équation 3 où $\rho_{matériau}$ correspond à la masse volumique du matériau et $\rho_{échantillon}$ à la masse volumique apparente de l'échantillon. Cette dernière est obtenue en divisant la masse de l'échantillon par son volume.

$$\Pi = 1 - \frac{\rho_{échantillon}}{\rho_{matériau}}$$

Équation 3 : Evaluation de la porosité totale par gravimétrie ($\rho_{matériau}$: masse volumique du matériau ; $\rho_{échantillon}$: masse volumique apparente de l'échantillon)

♦ La porosité ouverte π peut être mesurée par porosimétrie à mercure. L'échantillon est placé dans un pénétromètre et imprégné par du mercure. La valeur de la porosité ouverte π est donnée par l'Équation 4 où $V_{intrusion}$ correspond au volume total de mercure introduit et $V_{échantillon}$ au volume total de l'échantillon [88].

$$\pi = \frac{V_{intrusion}}{V_{échantillon}}$$

Équation 4 : Evaluation de la porosité ouverte par intrusion au mercure ($V_{intrusion}$: volume total de mercure introduit ; $V_{échantillon}$: volume total de l'échantillon)

La porosité ouverte π peut également être obtenue en immergeant l'échantillon dans un liquide. La valeur de la porosité ouverte est alors donnée par l'Équation 5 où V_1 , V_2 et V_3 correspondent respectivement au volume initial de liquide, au volume total comprenant le liquide et l'échantillon immergé et au volume de liquide restant après retrait de l'échantillon.

$$\pi = \frac{V_1 - V_3}{V_2 - V_3}$$

Équation 5 : Evaluation de la porosité ouverte π par déplacement de liquide (V_1 : volume initial de liquide ; V_2 : volume total comprenant le liquide et l'échantillon immergé ; V_3 : volume de liquide restant après retrait de l'échantillon)

♦ La porosité fermée δ peut ensuite être obtenue par différence entre la porosité totale Π et la porosité ouverte π selon l'Équation 6.

$$\delta = \Pi - \pi$$

Équation 6 : Calcul de la porosité fermée δ (Π : porosité totale ; π : porosité ouverte)

♦ La taille des pores peut être mesurée par porosimétrie à intrusion de mercure. L'échantillon est placé dans un pénétromètre et imprégné avec du mercure sous une pression croissante. Au fur et à mesure que la pression P augmente, le rayon r de pores pouvant être remplis diminue selon l'équation de Washburn, en supposant un modèle de pore cylindrique [89] (Équation 7).

$$r = \frac{2 \gamma \cos \theta}{P}$$

Équation 7 : Détermination de la taille des pores r par porosimétrie à intrusion de mercure (P : pression ; γ : tension de surface du mercure ; θ : angle de contact)

Cette méthode permet une large étendue de mesure d'environ 10^{-3} à 10^2 μm . Elle peut donc être utilisée, en particulier, pour des mesures de tailles de micropores et d'interconnexions au sein d'échantillons en céramique (Figure 5).

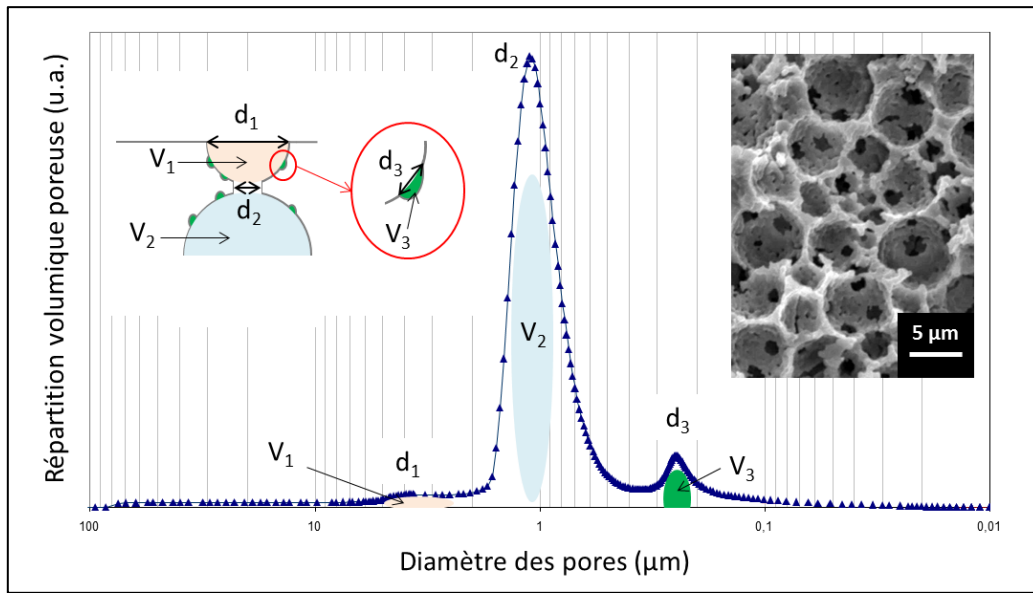


Figure 5 : Courbes de porosimétrie mercure obtenues à partir d'échantillons microporeux élaborés par hétérocoagulation [86] (d_1 et V_1 : diamètre et volume des pores ouverts ; d_3 et V_3 : diamètre et volume des micropores présents sur les parois ; V_2 : volume des pores internes interconnectés ; d_2 : diamètre des interconnexions)

Les autres méthodes physiques de type condensation capillaire, thermoporométrie, ou encore diffusion aux petits angles des rayons X, ne sont pas décrites ici car leur domaine d'utilisation se limite à des tailles de pores inférieures au micromètre, ce qui sort du cadre de la présente étude.

Des méthodes optiques et électroniques peuvent également être utilisées pour déterminer la taille et/ou la distribution en taille des grains et des pores. Chaque méthode est adaptée à un intervalle de taille. Les méthodes optiques, que sont la loupe et le microscope optique, peuvent être utilisées pour observer des macropores ou éventuellement des micropores de grande taille, leurs domaines d'utilisation étant limités à 10 et à 1 μm respectivement. En revanche, les méthodes électroniques, que sont la microscopie électronique à balayage (MEB) et la microscopie électronique en transmission (MET) sont plus adaptées à l'observation de la microporosité, leur domaine d'utilisation étant plus étendus et pouvant descendre à 10^{-2} et 10^{-3} μm respectivement. La taille des micropores peut alors être évaluée par analyse des micrographies MEB à l'aide de logiciels adaptés. Contrairement aux méthodes citées précédemment, ces techniques d'imagerie fournissent des

informations sur la géométrie des pores. Cependant l'analyse et l'interprétation des micrographies peut se révéler difficile et incertaine [90].

Enfin, la porosité et la taille des pores peuvent être déterminées par microtomographie. Il s'agit d'une méthode non invasive qui consiste en la création d'images en trois dimensions, résultant de la compilation et de l'analyse d'images en deux dimensions (tranches isotropes). Cette méthode peut être utilisée pour caractériser aussi bien des implants poreux synthétiques [91] que des os [92]. Elle peut donc servir également à quantifier une réparation osseuse [93].

Les différentes techniques de caractérisation de la porosité décrites ci-dessus présentent toutes des avantages et des inconvénients. Pour certaines méthodes, les résultats obtenus dépendent des valeurs des constantes physiques utilisées pour les calculs, comme par exemple la tension de surface du mercure (Équation 7). Dans certains cas, les résultats reposent également sur des hypothèses de géométrie des pores, en particulier pour la porosimétrie à intrusion de mercure où le calcul est effectué en supposant des pores cylindriques. Il est donc indispensable, lorsque c'est possible, de coupler plusieurs méthodes de mesures complémentaires pour caractériser la porosité. Enfin, les valeurs de porosité et de tailles de pores citées dans la littérature ne peuvent être comparées sans prise en compte des méthodes de mesures utilisées.

I.4.2 Macrostructure

Cette première section traite des rôles possibles des paramètres architecturaux sur la réparation osseuse, mis en évidence par plusieurs auteurs lors d'études expérimentales. *In vitro*, l'ostéogénèse ne semble pas être systématiquement affectée par les paramètres macrostructuraux mais la plupart des études menées *in vivo* montre qu'elle dépend de plusieurs paramètres architecturaux : le pourcentage de macroporosité, la taille et la géométrie des macropores, ainsi que les interconnexions entre ces pores.

I.4.2.1 Taux de porosité

Le taux de porosité des substituts osseux peut avoir une grande influence sur la réparation osseuse et sur les propriétés mécaniques de ces édifices lorsqu'ils sont implantés.

Une augmentation du taux de porosité dans les implants doit, en principe, permettre la promotion de la repousse osseuse au sein de ces derniers. Mais plus les implants sont poreux avant implantation, plus la résistance mécanique qu'ils offrent une fois implantés se révèle faible [94]. Afin d'observer l'influence du taux de porosité sur ces deux paramètres, plusieurs études *in vivo*, dont les principaux résultats sont résumés dans le Tableau 3, ont été menées sur différents matériaux (HA et BCP) en faisant varier le pourcentage de porosité.

Référence	Matériau	Taux de porosité (%)	Site d'implantation	Durée d'implantation	Taux de porosité optimal	Critère
Lehuc <i>et al.</i> [94]	HA	22 à 65	NI	NI	22 %	Mécanique
Gauthier <i>et al.</i> [95]	BCP	40 et 50	Osseux (partie distale de fémur de lapin)	8 semaines	40 %	Biologique
Hing <i>et al.</i> [96]	HA	NC	Osseux (partie distale de fémur de lapin)	10 jours, 5 semaines	NC	Biologique et mécanique
Kruyt <i>et al.</i> [97]	HA	60 et 70	Musculaire (muscles paravertébraux de chèvre)	12 semaines	70 %	Biologique
Hing <i>et al.</i> [98]	HA	60 et 80	Osseux (partie distale de fémur de lapin)	5, 13, 26 semaines	60 %	Mécanique

Tableau 3 : Taux de porosité rencontrés dans la littérature (NC : non communiqué ; NI : non implanté)

Ces études montrent qu'un compromis doit être trouvé. Un taux de porosité suffisamment élevé (> 40 %) doit permettre de favoriser la recolonisation osseuse d'une part. Un maintien mécanique de l'implant durant sa période d'intégration doit être assuré par une valeur limite haute de ce taux de porosité (< 80 %) d'autre part. L'intervalle de valeurs satisfaisantes pour le taux de porosité (40-80 %) est assez large car la valeur optimale dépend également d'autres paramètres architecturaux tels que la taille des pores, leur géométrie ou encore les connexions entre ces pores. Par exemple, des études *in vivo* réalisées en sites osseux, avec des implants constitués d'HA et/ou de BCP (HA+ β -TCP), ont montré que l'influence du taux de porosité sur le volume d'os formé était négligeable par rapport à l'influence de la taille des pores [95] ou à l'influence de la taille des connexions entre les pores [96,98], en particulier dans les premiers temps suivant l'implantation. Le taux de porosité semble avoir une influence plus conséquente à moyen et à long termes, sur le volume

d'os formé. De plus, le taux d'os formé modifie lui-même l'environnement mécanique local de l'implant. Les faibles performances mécaniques initiales d'un implant peuvent donc être renforcées par le phénomène de repousse osseuse.

De très bons résultats biologiques obtenus pour certaines valeurs de taux de porosité pourraient donc être attribués également à l'influence d'autres paramètres architecturaux. Pour comprendre réellement le rôle du taux de porosité, il serait nécessaire de fixer précisément tous les autres paramètres architecturaux, ce qui est difficile voire impossible à mettre en œuvre car ces paramètres sont liés entre eux. Par conséquent, pour déterminer un taux de porosité optimal pour un implant, il est nécessaire de prendre en compte les autres paramètres architecturaux décrits dans la suite de cette section.

I.4.2.2 Taille des macropores

La maîtrise du taux de macroporosité d'un implant est nécessaire pour assurer la régénération osseuse et la tenue mécanique de ce dernier, mais elle n'est pas suffisante. Comme indiqué au paragraphe I.4.2.1, selon Gauthier *et al.* [95], la taille des pores aurait un impact plus important sur la repousse osseuse que le taux de porosité.

L'utilisation de pores de trop petite taille peut empêcher la pénétration cellulaire au sein des implants en raison de l'occlusion des pores par les cellules. La taille des cellules est donc le premier paramètre limitant pour la taille des macropores. La majeure partie des cellules impliquées dans le phénomène d'ostéogénèse a une taille de l'ordre de quelques dizaines de micromètres et elles peuvent atteindre jusqu'à 100 μm pour les plus volumineuses, certains ostéoclastes. D'autres paramètres à prendre en compte pour définir la taille des macropores sont les conditions de migration des cellules. La taille de pores minimale pour satisfaire ces exigences a été étudiée sur différents matériaux. Ainsi, Hulbert *et al.* [99] ont implanté des disques poreux en céramique ($\text{CaO}.\text{Al}_2\text{O}_3$, $\text{CaO}.\text{TiO}_2$, et $\text{CaO}.\text{ZrO}_2$) et montré que la taille de pore minimale requise pour l'ostéoconduction était de 100 μm . La taille de pores optimale semblait être plus élevée (dans cette étude la valeur optimale suggérée était de 150 μm). Des cultures d'ostéoblastes réalisées sur des substituts en polymère avec différentes tailles de pores (40, 60 and 100 μm) par Akay *et al.* [100] ont montré, après 35 jours, une pénétration de ces cellules dans tous les implants mais les taux de migration de ces dernières se sont révélés plus importants au sein des pores de 100 μm que dans les pores de plus petite taille.

Certaines études *in vivo* ont montré que la repousse osseuse était possible au sein d'implants comportant des pores de taille inférieure à 100 μm mais des pores plus larges semblent plus adaptés [101]. Par exemple, Uchida *et al.* [102] ont obtenu une croissance de tissus plus satisfaisante dans le cas des pores de grande dimension (210-300 μm) que dans le cas des pores de plus petite taille (150-250 μm), au sein de disques en céramique (alumine de calcium, HA et TCP) implantés en sites osseux. Chang *et al.* [103] ont observé une formation osseuse dans des substituts d'HA poreux constitués uniquement de pores de 50 μm , implantés en site osseux, mais l'ostéoconduction était meilleure dans le cas des pores de 300 μm .

Cependant, la dimension des cavités dans l'implant ne peut pas être définie uniquement par la taille des cellules et par l'espace nécessaire à leur migration. Pour permettre une prolifération cellulaire continue, le métabolisme des cellules doit être maintenu au sein de l'implant. Afin d'assurer ce métabolisme, les nutriments et l'oxygène dont elles ont besoin doivent pouvoir leur être fournis au sein des implants par des vaisseaux. La taille des pores est donc aussi imposée par l'espace requis pour l'invasion de ces vaisseaux, c'est le phénomène de vascularisation. Il a été montré que si la vascularisation est limitée et la pression d'oxygène trop basse, la chondrogenèse est favorisée au dépend de l'ostéogénèse [19]. Plus récemment, l'importance de la vascularisation dans le processus de repousse osseuse a été mise en évidence par Habibovic *et al.* [104] qui ont observé une formation osseuse lors de l'implantation intramusculaire d'un échantillon poreux en BCP alors que le même échantillon n'a induit aucune formation osseuse lors de son implantation en site sous-cutané où la vascularisation est connue pour être beaucoup moins importante. Pour déterminer la taille minimale requise pour les macropores, ce phénomène doit donc être pris en compte. Les études menées *in vitro* ne permettent pas de le prendre en considération, c'est pourquoi des études *in vivo* ont été réalisées par plusieurs auteurs. Les principaux résultats sont résumés dans le Tableau 4.

Réf	Materiau(x)	Tailles de macropores (µm)	Site d'implantation	Durée d'implantation
Hulbert <i>et al.</i> [99]	CaO.Al ₂ O ₃ , CaO.TiO ₂ , CaO.ZrO ₂	45-100 µm et 100-150 µm	Musculaire et osseux (lapin)	1 semaine; 3, 6, et 9 mois
Uchida <i>et al.</i> [102]	CaO.Al ₂ O ₃ , HA, TCP	150 to 210 et 210 to 300	Osseux (crâne de rat et lapin)	6 mois
Daculsi <i>et al.</i> [101]	Phosphate de calcium	100 to 600	Osseux (chien)	1 mois
Kuhne <i>et al.</i> [105]	HA (corail)	200 et 500	Osseux (condyle fémoral de lapin)	12 et 26 semaines
Schwartz <i>et al.</i> [106]	Polylactide	100, 200, et 350	Osseux (crâne de lapin)	1, 2, 4, 6 mois
Tsuruga <i>et al.</i> [107]	HA	106-212, 212-300, 300-400, 400-500 et 500-600	Souscutané (rat)	4 semaines
Gauthier <i>et al.</i> [95]	BCP	300 et 565	Osseux (partie distale du fémur de lapin)	8 semaines
Ayers <i>et al.</i> [108]	Nitinol	178, 218 et 353	Osseux (crâne de lapin)	6 semaines
Chang <i>et al.</i> [103]	HA	50, 100x120, 250, 300, et 500	Osseux (tibia de lapin)	8 semaines
Kuboki <i>et al.</i> [109]	HA	90-120, et 300-400	Souscutané (rat)	1-4 semaines
Schek <i>et al.</i> [110]	HA et PPF/TCP	300 et 800	Souscutané (souris)	4 semaines
Roosa <i>et al.</i> [111]	Polycaprolactone	350, 550, 800	Souscutané (souris)	4 et 8 semaines
Fukuda <i>et al.</i> [112]	Titane (traité chimiquement)	500, 600, 900, et 1200	Musculaire (muscles dorsaux de chien)	16, 26, et 52 semaines

Tableau 4 : Tailles de macropores rencontrées dans la littérature lors d'études *in vivo* (PPF : polypropylène fumarate)

Les premières études *in vivo* investiguant l'influence de la taille des pores d'implants phosphocalciques sur la réparation osseuse ont été réalisées principalement avec de l'HA provenant de corail. Par exemple Kühne *et al.* [105] ont implanté des substituts d'HA issu de corail avec deux tailles de pores (200 et 500 µm) en site osseux et ont observé la formation d'os dans les implants contenant des pores de 500 µm mais rien dans les implants contenant les pores de 200 µm. L'étude *in vivo* menée par Tsuruga *et al.* [107] a montré que des substituts d'HA avec une taille de pores de 300-400 µm implantés en site sous-cutané ont permis des taux de formation osseuse plus élevés que dans le cas de substituts similaires contenant des pores de plus petites dimensions (106-212 µm et 212-300 µm) ou de plus grandes dimensions (400-500 et 500-600 µm). Mais, lors de cette étude, des vaisseaux ont été observés au sein des pores les plus larges (400-500 et 500-600 µm) et non au sein des pores de plus petites dimensions. Dans le cas de BCP, Gauthier *et al.* [95] ont observé une

ostéoconduction plus importante pour des implants constitués des pores de 565 μm de diamètre que dans ceux contenant des pores de 300 μm .

Des études *in vivo* conduites avec d'autres matériaux ont également montré que des pores de 100 μm voire 200 μm étaient trop petits pour constituer le support d'une repousse osseuse. Par exemple, une formation osseuse a été observée au sein de disques en polyacrylamide (PLA) implantés en sites osseux par Schwartz *et al.* [106] pour des pores de 350 μm mais rien ne s'est produit dans le cas de pores de 100 et 200 μm . Fukuda *et al.* [112], ont observé une meilleure ostéoinduction d'implants en titane traités chimiquement et thermiquement, pour des pores tubulaires de type canaux parallèles à section quadratique de 500 μm de diagonale comparés à des pores similaires plus larges (600, 900 et 1200 μm) (Figure 11-b et c, p 58). Ces résultats suggèrent que des valeurs trop élevées de tailles de pores ne sont pas forcément requises ni plus adaptées à l'induction de formation osseuse. Mais la limitation de l'étude à des tailles supérieures à 500 μm empêche de relever une dimension optimale de taille de pore. Dans d'autres études (Tableau 4), l'effet de la taille des macropores (entre 300 et 800 μm) sur la génération de substance osseuse n'a pas pu être mis clairement en évidence. Par exemple, Roosa *et al.* [111] ont implanté, en site sous-cutané, des substituts en polycaprolactone (PCL) contenant des pores cylindriques orthogonaux interconnectés d'architecture identique mais avec différentes tailles de macropores (350, 550 et 800 μm) dopés par des BMP (*bone morphogenetic protein*). Ils ont remarqué que la formation osseuse au sein des pores dépendait de la taille des pores à 4 semaines d'implantation mais aucune différence n'a été observée à 8 semaines d'implantation. De même, Ayers *et al.* [108] ont comparé les taux de substance osseuse formée au sein de substituts en nitinol, de différentes tailles moyennes de pores (178, 218 et 353 μm) implantés en site osseux. Aucune différence significative n'a pu être détectée entre les trois types d'implants après six semaines d'implantation. Enfin, Schek *et al.* [110] n'ont pas pu observer d'effet significatif, sur la formation de tissus osseux, de la taille des pores (300 et 800 μm) de substituts d'HA et de polypropylène fumarate (PPF)/TCP implantés pendant quatre semaines en site sous-cutané. L'effet de la taille des pores semble pouvoir être mis plus facilement en évidence pour certaines durées d'implantation, ce paramètre architectural paraît donc avoir une influence sur certaines étapes du processus de repousse osseuse.

Des blocs poreux d'HA avec des tailles de pores différentes ont été implantés en site sous-cutané par Kuboki *et al.* [109]. Cette étude a mis en exergue la formation de cartilage précédant la formation d'os au sein de tunnels de petit diamètre (90-120 μm) alors que des implants contenant des tunnels plus large (300-400 μm) ont conduit à une formation osseuse directe. Ces résultats montrent que le phénomène de formation osseuse peut faire appel à différents mécanismes selon l'environnement architectural au sein duquel il se produit et en particulier selon l'espace disponible engendré par la taille des macropores.

Par ailleurs, des travaux plus récents, réalisés *in vitro* par Murphy *et al.* [113], sur des échantillons poreux de collagen-glycosaminoglycan, ont permis de mettre en évidence l'effet bénéfique d'une surface spécifique élevée délivrée par des pores de petite taille (environ 120 μm) sur l'adhésion cellulaire initiale d'ostéoblastes, en comparaison à des tailles de pores supérieures (164, 190 et 325 μm). Mais la migration cellulaire facilitée par des pores plus larges (environ 300 μm) semble surpasser cet effet. Une augmentation significative de l'attachement cellulaire a, en effet, été remarquée au sein des échantillons contenant des pores de petites tailles, au bout de 24 h et 48 h, mais une diminution apparaît au bout de 7 jours. Ces résultats évoquent l'importance d'une surface spécifique élevée et le contraste avec la nécessité de pores assez larges permettant une migration cellulaire aisée. Ce compromis entre surface spécifique élevée et taille de pores élevée conduit à développer des substituts contenant des pores larges et des parois fines, ce qui rejoint l'idée d'un taux de porosité élevé évoqué au paragraphe I.4.2.1, ou encore des substituts contenant des pores de tailles variées. En particulier, une autre approche consiste à introduire des micropores dans les parois des macropores afin d'accroître la surface spécifique. Cet aspect sera détaillé au paragraphe I.4.3.

Finalement, malgré un nombre très important d'études *in vivo* réalisées durant les 20 dernières années, aucune valeur optimale de taille de macropore n'a pu être définie pour la repousse osseuse. Toutefois, il a pu être mis en évidence une ostéogénèse favorisée par la présence de macropores de diamètre supérieur à 300 μm [88]. Cette valeur semble correspondre à la taille de pore minimale nécessaire à l'attachement, à la migration, à la prolifération cellulaires et à la formation de vaisseaux. Mais la taille des macropores ne doit pas être non plus trop élevée, à priori elle ne doit pas dépasser 600 μm [112]. Cependant, de nombreuses contradictions ont émergé car plusieurs paramètres doivent être pris en considération, comme les propriétés chimiques des matériaux, les paramètres environnementaux (espèces animales, sites d'implantation, ajout de molécules bioactives...)

ou encore les paramètres structuraux autres que la taille des macropores (taux de porosité, géométrie des pores, interconnexions, taille et géométrie de l'implant...). En particulier, l'implication des interconnexions dans le processus de colonisation osseuse des implants fait l'objet du paragraphe suivant.

I.4.2.3 Interconnexions

Les connexions entre les pores sont requises pour garantir des passages entre ces derniers. La connectivité des pores permet de bonnes pénétrations cellulaire et vasculaire nécessaires à la recolonisation osseuse au sein de l'implant [114] et peut être mise en évidence par une perméabilité élevée des implants [115,116]. Des études *in vivo* ont permis de souligner l'utilité de ces connexions. Les principaux résultats sont reportés dans le Tableau 5.

Réf	Matériau	Pores (µm)	Connexions (µm)	Site	Durée	Resultats
Eggli <i>et al.</i> [117]	HA et β-TCP	50-100 µm et 200-400 µm (60%)	> 20 µm	Osseux (partie distale de fémur et tibia de lapin)	6 mois	Croissance des vaisseaux et des tissus favorisée par les interconnexions
Lu <i>et al.</i> [118]	HA et β-TCP	100-300 (50%)	20 - 160	Osseux (partie latérale de fémur de lapin)	12 et 24 semaines	20 µm : tissu chondroïde 25 µm : tissu osseux fibrillaire 50 µm : os minéralisé
Hing <i>et al.</i> [96]	HA	500 x 350 750 x 400 1500 x 550	NC	Osseux (condyle de fémur de lapin)	5 semaines	Volume de croissance osseuse influencé par l'interconnectivité
Flautre <i>et al.</i> [119]	HA	175 - 260	30, 60, 100 et 130	Osseux (partie distale de fémur de lapin)	12 semaines	Meilleure pénétration cellulaire et vasculaire pour des interconnexions de 130 µm
Hing <i>et al.</i> [98]	HA	500 x 350 (621%) 1500 x 550 (81%)	NC	Osseux (condyle de fémur de lapin)	5, 13 et 26 semaines	5 semaines : peu d'éléments de réparation 13 semaines : progression de la croissance osseuse 26 semaines : réparation totale de la surface articulaire

Tableau 5 : Tailles d'interconnexions rencontrées dans la littérature lors d'études *in vivo*

Lors d'une étude menée en 1988 par Eggli *et al.* [117], l'intégration en site osseux d'implants poreux en HA s'est révélée étonnamment plus satisfaisante pour une taille de pores faible (50-100 µm) que dans le cas des pores plus larges (200-400 µm) en raison d'une connectivité réduite entre les pores de grande taille comparée à celle des pores de petite taille (pour un taux de porosité fixé à 60 %). L'étude *in vitro* de Lu *et al.* [118] réalisée sur des

disques d'HA et β -TCP de taux de porosité et de taille de pores identiques, avec des interconnexions de 20 à 160 μm , a montré que des ostéoblastes pouvaient passer à travers des interconnexions d'une taille supérieure à 20 μm pour coloniser des macropores de 100-300 μm et proliférer au sein de ces derniers. Mais la pénétration de ces cellules semblait favorisée dans le cas d'interconnexions de taille supérieure à 40 μm .

Plusieurs études *in vivo* ont permis d'obtenir plus de détails sur le type de tissus pouvant se développer au sein d'implants poreux selon la taille des interconnexions. Lu *et al.* [118] ont montré, à partir d'une étude réalisée sur des substrats d'HA et β -TCP, durant 14 et 28 jours, qu'une taille d'interconnexion supérieure à 20 μm permettait la pénétration d'ostéoblastes, mais qu'uniquement des tissus chondroïdes pouvaient être formés à l'intérieur de pores ainsi connectés. En revanche une taille d'interconnexion de plus de 50 μm permettait la formation d'os minéralisé. Ces résultats mettent en évidence l'importance des interconnexions au sein des implants poreux. Toutefois, les autres paramètres architecturaux tels que le taux de porosité ou encore la taille et la distribution des macropores n'étaient pas suffisamment maîtrisés lors de cette étude pour en tirer des conclusions précises sur l'effet de la taille des connexions. Cette étude a été complétée par celle de Flautre *et al.* [119] qui ont fixé le diamètre des pores (175-260 μm) de substituts d'HA implantés en site osseux dans le but de comparer quatre tailles d'interconnexion (30, 60, 100 et 130 μm). Les implants contenant des pores reliés par des connexions de taille élevée (130 μm) se sont révélés être les plus propices aux pénétrations cellulaire et vasculaire.

Plus récemment, Melchels *et al.* [116] ont comparé, *in vitro*, deux types de substituts en poly(D,L)-lactide (PDLA) d'architectures différentes, l'une de type gyroïde obtenue par stéréolithographie et l'autre aléatoire obtenue par lixiviation, avec des taux de porosité et des tailles moyennes de pores similaires (Figure 6). Pour une même durée de culture, les interconnexions trop petites (environ 50 μm) de l'architecture aléatoire étaient complètement obstruées, empêchant ainsi l'apport de nutriments et d'oxygène aux cellules à l'intérieur des substituts. En revanche, les larges interconnexions (100 μm) des substituts de type gyroïde sont demeurées ouvertes, permettant ces transports et générant ainsi une prolifération cellulaire (cellules iMSC) au centre de l'échantillon, contrairement à la structure aléatoire pour laquelle aucune cellule n'a pu être observée dans la section centrale de l'échantillon.

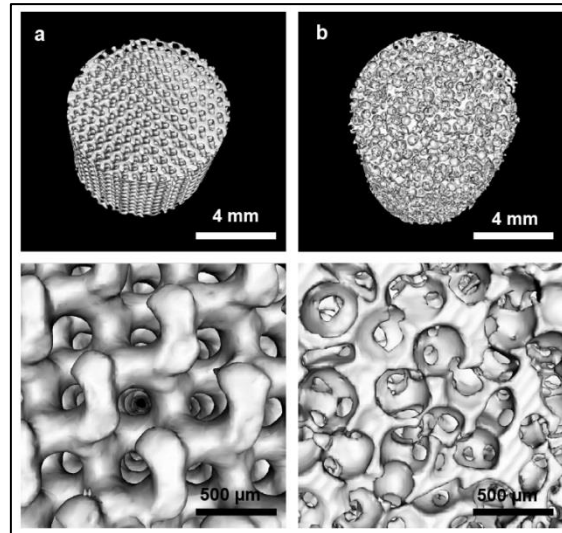


Figure 6 : Observations par microtomographie de substituts de PDLLA d'architecture gyroïde réalisée par stéréolithographie (a) et d'architecture aléatoire réalisée par lixiviation (b), Melchels et al. [116]

La présence des interconnexions, puisqu'elles promeuvent les pénétrations cellulaire et vasculaire, est à priori pertinente principalement lors des premiers stades de la régénération osseuse. Cette hypothèse peut être appuyée par les résultats obtenus par Hing *et al.* [96,98] après l'implantation de substituts d'HA en sites osseux pendant différentes périodes (5, 13 et 26 semaines) afin d'évaluer l'influence de paramètres structuraux à court, moyen et long termes. Ils ont pu observer, à court et à moyen termes, que le taux de formation osseuse était tout d'abord influencé par le taux d'invasion cellulaire et par le taux de vascularisation, concluant que la connectivité entre les pores était le facteur influant majeur à court et à moyen termes.

Pour conclure, les différentes études présentées précédemment indiquent toutes que les connexions entre les pores des substituts sont nécessaires pour la colonisation osseuse au sein des implants. La taille de ces interconnexions doit être supérieure à 50 μm pour permettre la formation d'os minéral. Une taille d'interconnexion d'environ 100 μm semble favoriser l'infiltration des nutriments et de l'oxygène à l'intérieur des implants. Enfin, la taille et la répartition de ces connexions sont corrélées aux autres paramètres structuraux que sont la taille et la géométrie des pores, dont il est difficile de dissocier l'influence.

I.4.2.4 Géométrie des pores

De nombreuses architectures de substituts se sont révélées appropriées à la repousse osseuse. La structure des substituts osseux peut être spongieuse, elle peut inclure des pores linéaires parallèles ou des pores sphériques interconnectés, ou encore être constituée de lignes de matière croisées et empilée, etc. Mais la réponse ostéogène semble différer selon la géométrie des pores.

Depuis le début des années 2000, de nombreuses équipes de recherche se sont intéressées à la géométrie même des pores. Le lien entre la configuration architecturale des pores et le processus de régénération osseuse a pu être rapporté lors d'investigations expérimentales *in vitro* et *in vivo*, résumées dans les Tableau 6 et Tableau 7 respectivement. La description des architectures fait appel à trois types d'échelles : une échelle tridimensionnelle permettant la description globale des géométries poreuses, une échelle en 2D adaptée à la définition des sections de ces géométries poreuses, et une échelle linéaire locale visant à analyser la courbure des parois poreuses. Les échelles linéaire et 2D sont principalement utilisées pour décrire des phénomènes observés lors d'études *in vitro*. Les résultats issus de ces études sont difficilement transposables à des architectures 3D. Ces dernières ont fait l'objet d'études *in vivo*. Les architectures développées pour ces études *in vivo* sont illustrées en Figure 7.

Réf	Matériau	Géométrie(s) de macropores	Culture	Principaux résultats
Rose <i>et al.</i> [120]	HA	Pores ouverts de géométrie aléatoire (282µm; interconnexions : 72 µm) + canal central (170 à 421 µm)	Cellules d'ostéosarcome humain 8 jours	• Parois internes des canaux recouvertes de cellules • Augmentation de la pénétration et de la prolifération cellulaire avec le diamètre des canaux
Woesz <i>et al.</i> [121]	HA	Couches de tiges parallèles à section carrée (300 µm)	Préostéoblastes (MC3T3-E1) 2 et 4 semaines	• Comblement des fissures par les cellules • Plus de cellules sur l'intérieur des angles que sur les extérieurs • Collagène formé au sein des substrats • Cellules différenciées en ostéoblastes exprimant de l'ostéocalcine
Kumar <i>et al.</i> [122]	PCL et PDLLA	Architectures lisses, fibreuses, empilement de tiges, structures aléatoires	Cellules souches hBMSC	• Signature spécifique de l'expression des gènes pour chaque architecture • Morphologie des cellules influencée par l'architecture des substrats
Rumpler <i>et al.</i> [123]	HA	Pores traversants à section polygonale ou circulaire	Préostéoblastes (MC3T3-E1)	• Taux de tissu déposé proportionnel à la courbure des pores
Bidan <i>et al.</i> [124]	HA	Pores circulaires, canaux semi-circulaires	Préostéoblastes (MC3T3-E1) 4 semaines	• Influence de la géométrie du substrat sur le taux et la structure du tissu formé • Formation de cordes d'actine entre les points d'adhésion

Tableau 6 : Géométries de pores rencontrées dans la littérature lors d'études in vitro

Réf	Matériau	Architecture (Taille des pores)	Implantation	Principaux résultats
Chang <i>et al.</i> [103]	HA	• Pores linéaires parallèles cylindriques (50, 100, 300, 500 µm) (Figure 7-a) • Pores spongieux (250 µm) (Figure 7-b) • Tiges linéaires croisés (100 × 120 µm) (Figure 7-c)	Osseux (tibia de lapin) 4 et 8 semaines	• Ostéoconduction active pour tous les échantillons • Formation d'os et de moelle osseuse uniquement au sein des implants contenant des pores spongieux ou cylindriques de 300 et 500
Jin <i>et al.</i> [125]	HA	• Cylindre contenant des tunnels (Nids d'abeilles) (Figure 7-d) • Particules poreuses (Figure 7-e) • Blocs poreux (Figure 7-f)	Sous-cutané 1, 2, 3, 4 semaines	• Meilleure pénétration des vaisseaux sanguins et des cellules mésenchymateuses au sein des particules poreuses et des implants en nids d'abeilles que dans les blocs poreux, après 2 semaines
Chu <i>et al.</i> [126]	HA	• Pores radiaux (366µm) • Pores orthogonaux (444µm) (Figure 7-h)	Osseux (mandibules de cochon) 5 et 9 semaines	• Formation osseuse dans les 2 cas • Conception orthogonale : matrice HA+os • Conception radiale : masse intacte d'os générée au centre de l'implant (après 9 semaines)

Tableau 7 : Géométries de pores rencontrées dans la littérature lors d'études in vivo

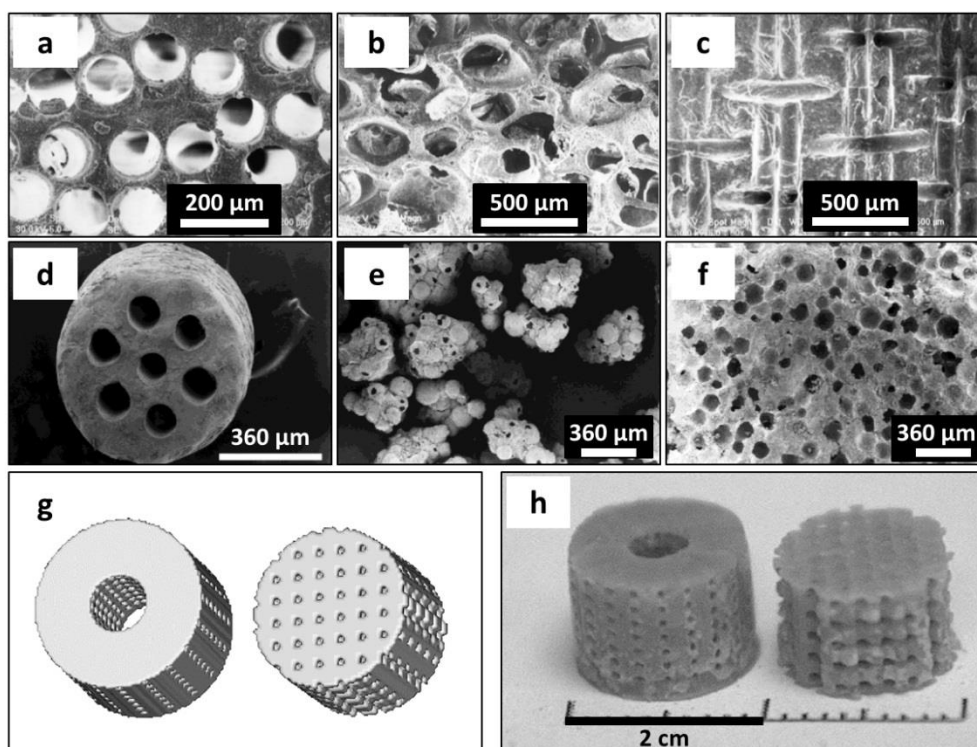


Figure 7 : Architectures utilisées lors d'études in vivo. Chang et al. [103] : pores linéaires parallèles cylindriques (a), architecture spongieuse (b) et tiges linéaires croisées (c) ; Jin et al. [125] : cylindre contenant des tunnels (d), particules (e), blocs (f) ; Chu et al. [126] : modèle (g) et photographie (h) des architectures à pores radiaux (gauche) et orthogonaux (droite)

Chang et al. [103] ont implanté, dans des tibias de lapins, des blocs poreux d'HA avec différentes architectures de pores : linéaires parallèles cylindriques (50, 100, 300 et 500 μm), spongieux et irrégulièrement interconnectés (250 μm) ou linéaires croisés (100 x 200 μm). Une ostéoconduction active a été observée pour tous les substituts, y compris dans le cas des pores de 50 μm . Mais l'os formé et la formation de moelle osseuse ont uniquement été observés au sein des implants contenant des pores spongieux ou cylindriques de 300 et 500 μm . Jin et al. [125] ont implanté, en site sous-cutané, des substituts poreux en HA de trois types d'architectures, dopés par des BMP, afin d'observer l'ostéogénèse. Après deux semaines d'implantation, des vaisseaux sanguins et des cellules mésenchymateuses ont pénétré plus profondément au sein des particules poreuses et dans les implants en nids d'abeilles que dans les blocs poreux. Contrairement aux autres implants, la formation de substance osseuse a été observée uniquement en surface des blocs et non dans leur centre. De même, l'activité ALP et le taux d'ostéocalcine étaient moins importants au sein des blocs. Ce

phénomène est expliqué par l'architecture tridimensionnelle des blocs, contenant des pores plus longs et non reliés, qui peut empêcher les cellules et les vaisseaux de pénétrer en profondeur dans les implants. Chu *et al.* [126] ont comparé les comportements biologiques de deux types d'implants cylindriques d'HA, l'un composé de canaux orthogonaux et l'autre de canaux radiaux. Après 9 semaines d'implantation dans des mandibules de cochons, une régénération osseuse normale s'est produite pour les deux types d'implants mais l'architecture du tissu osseux formé n'était pas la même dans les deux cas. Une matrice d'os mélangée à l'HA a été observée dans le cas des canaux orthogonaux alors que dans le cas de la conception radiale, une masse intacte d'os régénéré était présente au centre de l'implant. Ces résultats mettent en évidence l'impact de l'architecture et également de l'orientation des pores sur la régénération osseuse.

Dans certains cas, une nécrose peut être observée au centre des implants suite à une formation rapide de tissus osseux en surface de ceux-ci. Ce phénomène peut être attribué à un transfert limité des cellules et des nutriments vers le centre des implants. Certaines géométries permettent de favoriser ce transfert vers le centre des substituts et ainsi d'améliorer la prolifération au sein des implants en empêchant la nécrose dans ces derniers. Des simulations d'écoulement, réalisées à partir d'architectures 3D obtenues par microtomographie d'implants poreux, ont permis de faire le lien entre le débit d'écoulement des fluides biologiques et la taille et l'orientation des interconnexions par rapport à la trajectoire des fluides [127]. Une façon de favoriser l'accès au centre d'un implant est d'insérer un canal dans le milieu de ce dernier. Cette configuration a été étudiée *in vitro* par Rose *et al.* [120] sur des substituts d'HA constitués d'une géométrie de pore ouverte et aléatoire et contenant des canaux dont le diamètre variait selon les échantillons de 170 à 420 μm . Après 8 jours de culture de cellules d'ostéosarcome humain, une couche de cellules a été observée à l'intérieur des canaux et la surface recouverte par les cellules augmentait avec le diamètre de ces derniers. Ces résultats mettent donc en évidence l'utilité de la présence de canaux alignés au centre des implants pour la pénétration et la prolifération cellulaires au sein de ceux-ci.

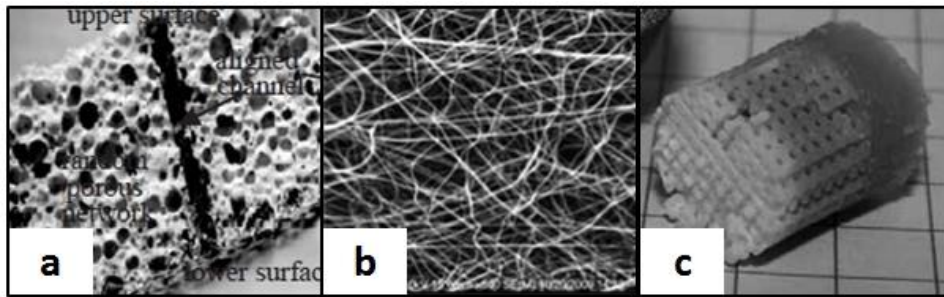


Figure 8 : Architectures poreuses : (a) aléatoire contenant un canal central [120], (b) fibreuse [122], (c) empilement de tiges parallèles à section quadratique [121]

Kumar *et al.* [122] ont pu souligner l'effet de la structure des substrats sur la différenciation de cellules souches lors d'une étude *in vitro* réalisée sur des substrats en polymère de différentes architectures et différentes compositions chimiques. Chaque architecture étudiée induisait une signature spécifique de l'expression des gènes au sein des cellules souches. Cette étude, leur a permis également de suggérer une influence plus importante de l'architecture des substrats que de leur composition chimique, sur le comportement cellulaire. Plus précisément, l'architecture des substrats pouvait induire une modification de la morphologie des cellules et, dans certains cas, engendrer leur différenciation vers une lignée spécifique. En particulier, les structures fibreuses semblent induire une elongation et une augmentation des ramifications des cellules souches, correspondant à une morphologie ostéogénique.

Il a été remarqué, lors de diverses études *in vitro* et/ou *in vivo*, que les couches cellulaires se formaient préférentiellement dans des zones bien particulières des substrats ou des implants poreux. Woesz *et al.* [121] ont réalisé des cultures de cellules préostéoblastes sur des substituts d'HA poreux constitués de couches de tiges parallèles à section carrée. Les cellules semblaient recouvrir prioritairement l'intérieur des angles (parties concaves, à courbure positive) plutôt que les extérieurs (parties convexes, à courbure négative). Il a été noté également, lors de cette étude, une tendance des cellules à remplir des fissures. Cette facilité d'attachement et de prolifération des cellules dans des zones incurvées ou fissurées peut être engendrée par un taux important de contacts des cellules entre elles et entre les cellules et la matrice extracellulaire. En effet, des taux de contacts élevés sont connus pour promouvoir la prolifération et la différenciation cellulaires [128]. D'autres cultures de préostéoblastes réalisées sur des pastilles d'HA, contenant des pores linéaires traversants à section polygonale, ont permis de mettre en évidence une formation de tissu initiale dans les

coins des tubes poreux et non sur les parois lisses de ces derniers [123,129]. Ce phénomène est généralement observé jusqu'à la modification globale de l'environnement local à l'intérieur du pore, engendrée par la présence du nouveau tissu formé. Le lien entre la courbure des pores et la formation locale de tissu a été étudié par le biais de simulations [123] et confirmé par plusieurs études expérimentales [124,129]. Cette influence de l'environnement local des cellules sur leur comportement fait actuellement l'objet de nombreuses études théoriques et expérimentales [130–134]. Certains travaux permettent de faire le lien entre l'environnement local des cellules et l'équilibre mécanique pouvant être établi par ces dernières [130] et entre le déclenchement de l'activité des cellules et les signaux mécaniques et chimiques résultant de cet équilibre [131]. Enfin, des corrélations ont pu être établies entre la formation de tissus osseux et la courbure de la surface sur laquelle les cellules déposent leur matrice extracellulaire [129]. Mais ces modèles mathématiques ont été établis sur la base de simulations et d'études réalisées *in vitro* et n'autorisent donc pas de prédire avec certitude une réponse biologique *in vivo*. Ces relations permettent néanmoins de comparer les vitesses de dépôt de tissus *in vitro* et leur répartition spatiale en fonction de la courbure des géométries de pores.

I.4.2.5 Conclusions sur la macrostructure

Le regroupement de plusieurs études *in vitro* et *in vivo* permet de montrer que les quatre paramètres structuraux suivants ont une influence sur l'habilité d'un substitut osseux à constituer un support viable pour la repousse osseuse :

- Le taux de porosité
- La taille des macropores
- Les interconnexions (taille, géométrie et répartition)
- La géométrie des macropores

Plusieurs études ont consisté à faire varier ces paramètres dans le but de comprendre leur rôle et de déterminer des valeurs, ou des intervalles de valeurs, optimales pour ces derniers. La nécessité de les contrôler a bien été mise en évidence à plusieurs reprises mais, malgré toutes les études menées, des valeurs optimales précises n'ont pas pu être définies pour ces paramètres. En fait, tous ces paramètres ne sont pas indépendants et ne peuvent pas

être examinés séparément. En outre, les impacts de chacun d'eux semblent survenir à des stades différents dans le processus de croissance osseuse.

Cependant, des intervalles de valeurs appropriées pour chaque paramètre macrostructural peuvent être définis. Le taux de porosité doit se situer entre 40 % et 80 %. Une taille de pores de 300 μm semble être suffisante pour permettre la formation de vaisseaux au sein des substituts et un ordre de grandeur de 300-600 μm paraît souhaitable pour y promouvoir l'attachement, la migration et la prolifération cellulaires. Enfin, une taille d'interconnexion de 50 μm a été évaluée dans certains cas comme suffisante pour permettre la formation d'os minéralisé, mais une taille minimale de 100 μm semble être requise pour l'infiltration de nutriments et d'oxygène à l'intérieur des implants. La taille maximale de ces connexions est limitée par la taille des macropores elle-même.

De plus, d'autres paramètres influencent fortement la régénération osseuse *in vivo* et doivent être pris en compte et si possible être fixés lors des études expérimentales. Parmi ces paramètres, nous trouvons les propriétés chimiques des matériaux, des paramètres environnementaux comme l'espèce animale, le site d'implantation [104,135], ou encore d'addition de molécules biologiques et enfin les paramètres microstructuraux qui seront détaillés dans la section suivante de cette synthèse bibliographique. La taille des implants peut également intervenir. Par exemple, Habibovic *et al.* [104] ont montré que des implants de grande taille avaient généré une quantité d'os plus importante que des petits implants, en raison, probablement, de leur surface périphérique plus élevée.

Concernant l'architecture globale des implants, de nombreuses géométries ont pu être testées par différents auteurs. Cependant, peu d'entre eux ont comparé ces différentes géométries dans les mêmes conditions expérimentales. Il est donc difficile de définir une géométrie particulière plus favorable à l'ostéogénèse. Mais, de façon générale, les architectures à porosité tortueuse non contrôlée (par exemple les réseaux réalisés à l'aide de porogènes) sont susceptibles de contenir des sections inaccessibles aux fluides biologiques, ce qui peut provoquer une nécrose. Ce problème peut être limité voire évité grâce à l'utilisation de substituts à architecture poreuse interconnectée contrôlée, incluant éventuellement des canaux qui peuvent faciliter l'invasion vasculaire et ainsi permettre le transport des nutriments et de l'oxygène au sein des implants. Enfin, l'attachement, la prolifération et la différenciation cellulaires semblent être plus élevés dans les zones anguleuses concaves des macropores, que dans les zones lisses ou convexes. Or, l'intégration d'un implant dans un organisme hôte

n'implique pas une production de tissu la plus rapide possible mais un dépôt de tissu contrôlé en termes de vitesse et de répartition. Ces paramètres garantissent, tout au long de l'intégration, une bonne perméabilité et des espaces libres pour la migration des cellules et pour la formation de matrice extracellulaire et de nouveaux tissus. La présence de concavités (courbures positives) au sein des macropores ainsi que la maîtrise de leur mise en forme semblent donc être la clef du contrôle de la cinétique d'intégration des implants osseux.

I.4.2.6 Limitations

Comme expliqué dans cette section, une structure macroporeuse tridimensionnelle interconnectée est nécessaire pour assurer le transfert des cellules et des nutriments dont elles ont besoin à travers le substitut afin d'engendrer l'ostéoconduction. Dans ce cas, le contact avec de l'os existant est nécessaire à la formation de nouvelle substance osseuse et cette formation démarre à l'interface entre l'os hôte et le matériau. Mais une formation trop rapide de tissu osseux sur les zones externes du substitut, couplée à un transfert incomplet des cellules, des nutriments, et des déchets, peut entraîner une nécrose des tissus présents au sein de l'implant. Par conséquent, la taille des implants est limitée. Dans le cas de défauts osseux de grande taille, l'ostéoinduction et l'angiogenèse deviennent nécessaires, car la substance osseuse peut être induite simultanément sur les parties externes et dans des zones internes de l'implant, favorisant ainsi la recolonisation de ce dernier.

Fujibayashi *et al.* [136] ont montré que des implants métalliques poreux en titane sous forme de blocs ont été capables d'induire la formation d'os dans des muscles dorsaux de chiens, après 12 mois d'implantation, alors que des implants cylindriques composés d'un maillage de fibres traités dans les mêmes conditions n'ont pu induire aucune substance osseuse dans ces mêmes sites. Ces résultats montrent que des matériaux, habituellement qualifiés d'« ostéoconducteurs », ou bien « inertes », peuvent se révéler ostéoinducteurs s'ils possèdent des propriétés de surface spécifiques, elles-mêmes directement liées à la microstructure. Cette implication de la microstructure des implants, dans les phénomènes de conduction et d'induction osseuses, est traitée dans le paragraphe suivant.

I.4.3 Microstructure

La microstructure des substituts en céramique peut être définie par la taille des grains, les micropores (taux, taille et géométrie) et par la rugosité de surface. Il a été montré, dans de nombreuses études, que les propriétés de surface avaient une influence sur le phénomène d'ostéoconduction [137,138]. De plus, une façon d'impliquer l'ostéoinduction au sein des substituts constitués de matériau ostéoconducteur, et en particulier les phosphates de calcium, serait d'introduire des micropores dans la structure macroporeuse qui demeure toujours essentielle pour supporter la croissance osseuse. L'influence de la microstructure des substituts sur la croissance osseuse et l'ostéoinduction est décrite dans ce paragraphe.

Yuan *et al.* [139] ont comparé le comportement de deux types de substituts cylindriques d'HA implantés dans des muscles dorsaux de chiens. L'un était composé de macropores de taille moyenne de 200 μm et de parois lisses et denses et le second de macropores de taille moyenne de 400 μm et de parois rugueuses contenant des micropores induits par une basse température de frittage. Les implants microporeux ont induit une formation osseuse, ce qui n'était pas le cas des implants non microporeux. Cette étude montre que des substituts macroporeux à parois microporeuses peuvent induire une formation osseuse ectopique. Cependant les caractères ostéoconducteur et ostéoinducteur d'implants phosphocalciques microporeux, qui sont parfois observés, ne suffisent pas à prouver la nécessité de micropores sur les parois des macropores et ne permettent pas la compréhension du rôle de la microporosité sur ces phénomènes.

Plusieurs études ont été conduites, *in vitro* et *in vivo*, afin de comprendre l'influence des micropores sur les phénomènes d'ostéoconduction et d'ostéoinduction. Sur la base de ces études, plusieurs hypothèses peuvent être établies pour expliquer les effets de la microporosité :

- Promotion du phénomène de dissolution-reprécipitation ;
- Promotion de l'adsorption de matériel endogène ;
- Promotion de l'adhésion et de la différenciation cellulaire ;
- Promotion de la vascularisation.

I.4.3.1 Phénomène de dissolution-reprécipitation

Le phénomène de dissolution-reprécipitation a été souligné comme une des causes du caractère ostéogène des phosphates de calcium. Des études *in vivo* ont permis d'observer la présence de cristaux, en forme d'aiguilles, fraîchement formés à proximité de la surface des substituts, après implantation en site osseux [140]. Le principe de ce mécanisme est le suivant : la dissolution des phosphates de calcium conduit à la libération d'ions calcium et phosphate qui, en forte concentration à proximité de l'implant, peuvent précipiter pour former une couche d'apatite biologique. Cette dernière, par sa ressemblance avec l'environnement osseux, est susceptible de participer au déclenchement de la différenciation cellulaire vers une lignée ostéogénique.

La présence de micropores en surface de granules ou sur les parois de substituts macroporeux induit un accroissement considérable de la surface spécifique des implants. Diverses valeurs de surface spécifique mesurées sur des substrats ou des implants destinés à des études *in vitro* ou *in vivo* sont listées dans le Tableau 8. La surface spécifique des implants synthétiques demeure, en général, très inférieure à celle de l'os naturel qui a pu être située entre 100 et 200 m²/g en 1975 [141] et plus précisément, en 2013, entre 130 et 180 m²/g [142]. Le lien entre surface spécifique et microporosité souligne l'implication de la microporosité dans le mécanisme de dissolution-reprécipitation. En effet, une surface spécifique accrue signifie une plus grande surface réactive d'échange avec le milieu biologique environnant, ce qui permet une accélération du phénomène de dissolution.

Référence	Matériau	Surface spécifique des implants ou des substrats (m ² /g)
Akay <i>et al.</i> [100]	Polymère (disque)	4,85 ; 7,16 et 8,63
Rouahi <i>et al.</i> [143]	HA (disque)	0,41 et 0,96
Isaac <i>et al.</i> [144]	β-TCP (disque)	0,01 ; 0,54 et 1,73
Zhu <i>et al.</i> [145]	HA et BCP (poudre)	2,53 ; 2,45 ; 2,46 et 2,26
Wei <i>et al.</i> [146]	Mg-CaP (architecture 3D poreuse)	33 et 121
Li <i>et al.</i> [147]	BCP (disque)	0,84 et 1,21

Tableau 8 : Valeurs de surface spécifique mesurées sur des substrats ou des implants destinés à des études *in vitro* ou *in vivo*

L'influence de la microporosité sur l'accroissement de la dissolution a été vérifiée lors d'études *in vitro* où de fortes concentrations ioniques en calcium et phosphate ont été détectées à proximité d'édifices poreux, dans un environnement similaire au milieu

biologique [148]. La microporosité peut également jouer un rôle lors de l'étape de reprécipitation. Les micropores peuvent servir de supports aux ions calcium et phosphate, leur permettant ainsi de précipiter.

Wei *et al.* [146] ont observé en milieu acellulaire, pour des échantillons de phosphates de calcium de différentes compositions chimiques, une dissolution plus élevée et plus rapide des échantillons microporeux que des échantillons non microporeux. Ce comportement a été détecté par mesure des concentrations en ions magnésium, calcium et phosphore, après immersion des échantillons dans des solutions de Tris-HCl. Les valeurs obtenues se sont révélées plus élevées et augmentaient plus rapidement dans le cas des échantillons microporeux. *In vivo*, il est possible que la dissolution des échantillons microporeux ait eu lieu à un stade précoce de l'implantation, altérant ainsi très tôt la microstructure des implants. Cette modification de microstructure étant susceptible d'augmenter la surface des implants, elle pourrait donc faciliter leur dissolution.

Par ailleurs, des analyses de spectroscopie infrarouge et de thermogravimétrie réalisées, par Habibovic *et al.* [104], sur des échantillons de BCP explantés, ont révélé la présence de carbonates à la surface de matériaux microporeux suite à leur implantation en site sous-cutané, ce qui est cohérent avec la formation d'une couche d'apatite carbonatée biologique à la surface du matériau. Les pertes de masse mesurées sur ces échantillons explantés et les bandes infrarouges caractéristiques des carbonates se sont révélées plus importantes dans le cas des échantillons présentant de forts taux de microporosité. Lan Levengood *et al.* [149] ont également analysé le matériau formé *in vivo* sur les parois microporeuses d'échantillons biphasiques (HA + β -TCP) implantés en site osseux. Le matériau constituant la couche recouvrant l'implant a été assimilé à de la matrice osseuse à différents degrés de minéralisation, le marqueur biologique utilisé pour observer cette couche étant en mesure de marquer le collagène de la matrice osseuse et non l'apatite biologique. Enfin, lors de certaines études, l'implantation de BCP comportant des micropores sur les parois des macropores a conduit à l'induction osseuse au centre des implants et non à la périphérie de ceux-ci [150]. Ce comportement est cohérent avec l'hypothèse de dissolution reprécipitation. En effet, l'absence d'induction osseuse, en périphérie des implants, peut être due à une diffusion rapide des ions calcium et phosphore libérés, limitant ainsi l'augmentation locale de la concentration ionique nécessaire à la formation de l'apatite biologique.

Une augmentation de surface spécifique a été démontrée comme facteur favorable au mécanisme de dissolution-reprécipitation, mais jusqu'à une certaine limite. Habibovic *et al.* [104], ont montré qu'une surface spécifique très élevée d'implants en apatite carbonatée conduisait à une dissolution rapide de ces derniers, les empêchant ainsi de constituer le siège d'une induction osseuse. Une dissolution trop rapide des implants peut donc conduire à l'effondrement de la structure macroporeuse essentielle à la formation osseuse. Un tel comportement, dû au déséquilibre entre la dissolution de l'implant et la formation osseuse, a pu être observé lors d'études réalisées en site osseux [148]. A l'inverse, pour de trop faibles valeurs de taux de microporosité, les implants se dégradent très lentement et induisent des quantités négligeables d'os formé. Il y aurait donc une valeur minimale de taux de microporosité en-dessous de laquelle la formation osseuse ne peut pas être engendrée sans contact initial avec l'os et une valeur maximale au-dessus de laquelle la dissolution est trop rapide. Or, la surface spécifique croît avec le taux de microporosité. L'augmentation du potentiel ostéoinducteur des implants avec le taux de microporosité et l'existence d'une valeur limite de ce paramètre supposent l'existence d'une valeur « optimale » de surface spécifique pour un matériau donné. La maîtrise du mécanisme de dissolution-reprécipitation passe donc par un choix judicieux de taux de microporosité conduisant à une valeur de surface spécifique adaptée. Néanmoins, ce choix doit être couplé à celui de la composition chimique du matériau qui a aussi un impact considérable sur le phénomène de dissolution, comme il a été précisé dans les paragraphes I.1 et I.3.2 avec en particulier la dissolution élevée du β -TCP ou encore celle de SiHA favorisée par la quantité élevée de joints de grains.

Des différences significatives de cinétiques d'ostéoconduction et d'ostéoinduction sont parfois observées entre différents individus d'une même espèce pour le même type d'implants et pour un même site d'implantation [104,150]. Le mécanisme de dissolution-reprécipitation ne semble donc pas être la seule cause des phénomènes d'ostéoconduction et d'ostéoinduction. Des paramètres, de type endogènes, doivent également intervenir lors de ces phénomènes biologiques. En particulier, le mécanisme de dissolution-reprécipitation semble s'accompagner d'une adsorption de biomolécules endogènes, comme par exemple des facteurs de croissance, susceptibles de déclencher la différenciation des cellules vers une lignée ostéogénique.

I.4.3.2 Adsorption de matériel endogène

Les différentes quantités de biomolécules qui s'adsorbent *in vivo*, en surface d'un implant, peuvent expliquer les différences de cinétique d'ostéoconduction et d'ostéoinduction observées entre des individus d'une même espèce. Les analyses thermogravimétriques et par spectrométrie infrarouge, de la surface des échantillons, réalisées par Habibovic *et al.* [104], après implantation en site non osseux, montrent la présence de composés organiques non présents avant implantation. Ce résultat suggère une adsorption d'éléments bio-organiques tels que des protéines. De plus, ce phénomène d'adsorption est d'autant plus important et plus rapide que la surface des implants est élevée. La présence de micropores semble donc favoriser l'adsorption d'éléments endogènes à la surface des implants, en plus du mécanisme de dissolution-reprécipitation. Cette hypothèse est cohérente avec l'augmentation de la surface spécifique engendrée par la présence des micropores. En effet, une surface accrue est susceptible de conduire à une plus grande zone d'interaction, *in vivo*, entre les biomolécules et la surface des implants.

Cheng *et al.* [151] ont observé *in vivo* une ostéoinduction provoquée par des édifices macroporeux à parois microporeuses en phosphates de calcium biphasique et ont supposé ce phénomène comme étant le résultat de l'adsorption de biomolécules ostéogéniques à leur surface. Après douze semaines d'implantation, aucune ostéoinduction n'a été remarquée en sites sous-cutanés alors que ce phénomène a pu être observé, en sites musculaires proches du péroné, pour des implants identiques. De plus, l'ostéoinduction était plus importante en présence d'une fracture du péroné que dans le cas d'un péroné intact. Or, l'expression des BMP-2 augmente à un stade précoce de la guérison des fractures [3], ce qui crée un environnement ostéogénique à proximité de la fracture. Le phénomène d'ostéoinduction peut donc être associé à la présence des BMP-2 et leur intervention au niveau de l'implant semble être favorisée par la présence des micropores à la surface de celui-ci.

Rouahi *et al.* [143] ont comparé, *in vitro*, l'adsorption de protéines à la surface d'échantillons d'HA microporeux et d'HA non microporeux, évaluée par trois méthodes. Toutes ont révélé une quantité de protéines adsorbées plus importante dans le cas des échantillons microporeux.

Les travaux évoqués précédemment mettent en évidence l'influence de la microstructure sur l'adsorption de molécules biologiques, mais ne permettent pas d'expliquer le rôle exact des micropores sur ce phénomène d'adsorption. Il est possible que les molécules soient piégées au sein des micropores, mais aucune étude expérimentale n'a permis, à ce jour, de valider cette hypothèse. La capacité d'adsorption de biomolécules par une surface peut être évaluée de différentes façons. Généralement, elle est réalisée par quantification des molécules désorbées de la surface après un traitement thermique ou après une immersion dans une solution. Récemment, une méthode très précise a été développée. Cette méthode est basée sur l'analyse quantitative, par spectrométrie de masse, d'espèces gazeuses de faible masse qui se dégagent des biomolécules au cours d'un traitement thermique [152]. Cependant, toutes ces méthodes permettent l'évaluation d'une quantité de protéines adsorbées par unité de surface mais ne renseignent pas sur la localisation ou la répartition de ces molécules sur la surface.

I.4.3.3 Adhésion, prolifération et différenciation cellulaires

La mouillabilité peut être définie comme l'aptitude de la surface d'un matériau à se laisser mouiller par les liquides, c'est-à-dire de leur permettre de s'étaler sur la surface la plus grande possible. Cette caractéristique dépend principalement de la composition chimique du matériau mais peut être également influencée par l'état de surface. En particulier, une bonne mouillabilité doit résulter d'une grande surface spécifique engendrée par la microporosité. Wei *et al.* [146] ont mesuré la quantité d'eau absorbée sur des échantillons macroporeux, certains contenant des micropores sur la surface des macropores et d'autres, de même composition chimique, n'en contenant pas. La quantité d'eau absorbée s'est révélée significativement plus élevée sur les échantillons microporeux. Or, les propriétés d'absorption des implants conditionnent leurs propriétés biologiques. En particulier, l'habilité d'un implant à absorber l'eau peut impliquer une bonne biodégradabilité de ce dernier, facilitant ainsi les interactions entre cellules et matériau [153]. Ces interactions conditionnent le comportement cellulaire vis-à-vis de l'implant, qui débute par l'adhésion cellulaire. Par conséquent, la présence de micropores est susceptible de promouvoir l'adhésion cellulaire. L'influence de la topographie de surface sur le comportement cellulaire peut être mise en évidence, *in vitro*, par observation de la répartition et de l'orientation des cellules à la surface du matériau.

Des cultures de fibroblastes et d'ostéoblastes réalisées par Bignon *et al.* [154] sur des échantillons macroporeux de phosphate de calcium biphasique ont permis d'illustrer par MEB

le mécanisme d'invasion cellulaire sur ces matériaux. L'attachement cellulaire a pu être observé sur les parois microporeuses des macropores et des extensions cytoplasmiques réparties sur la microporosité pénétraient à l'intérieur de celle-ci, permettant ainsi l'invasion cellulaire à travers les macropores interconnectés. L'attachement cellulaire, bien que présent également sur les échantillons à parois denses, était beaucoup plus important dans le cas des échantillons microporeux. Ces résultats mettent en évidence l'affinité des cellules pour la microporosité et par conséquent le rôle de la microporosité dans la colonisation cellulaire. Toutefois, lors de cette étude, un attachement cellulaire a été remarqué également sur des échantillons à parois denses. Ces travaux ne permettent donc pas de conclure sur la nécessité de la microporosité pour le mécanisme observé ici, mais simplement de mettre en évidence la capacité de la microporosité à promouvoir ce phénomène. L'étude *in vitro* conduite l'année suivante par Annaz *et al.* [155] avec des ostéoblastes, pendant 1, 2, 14, et 30 jours sur des échantillons d'HA, a montré le rôle de la microporosité sur l'ancrage et la fixation initiale des cellules, en particulier par l'observation au MEB de filopodes orientés vers les micropores. Néanmoins, aucun effet significatif de la microporosité sur la morphologie cellulaire, à plus long terme, n'a été relevé. Pendant la même période, l'étude *in vitro* de Rouahi *et al.* [143], réalisée avec des cellules osseuses humaines SaOs-2, a révélé des différences morphologiques entre les cellules placées sur des échantillons d'HA microporeux et celles présentes sur des échantillons d'HA denses. Les cellules situées sur les échantillons microporeux présentaient des bordures cytoplasmiques indiscernables de la surface des échantillons avec la présence de lamellipodes observables à l'extrémité des cellules, alors que les cellules présentaient une géométrie polygonale classique lors de leur étalement sur les surfaces denses. Là encore, les différences morphologiques ont été observées uniquement lors des premiers temps d'incubation (5 h et 1 jour) mais la prolifération cellulaire semblait plus faible sur les échantillons microporeux au bout de 4 jours d'incubation. Les deux études citées précédemment mettent en évidence l'influence des micropores sur l'attachement cellulaire initial. Une étude *in vitro* plus récente, réalisée par Wei *et al.* [146], a montré un attachement cellulaire (ostéoblastes MG₆₃), au bout de 4 heures de culture, plus important dans le cas d'échantillons possédant des micropores que dans le cas des échantillons non microporeux.

L'adhésion cellulaire est une étape essentielle de l'interaction entre le biomatériau et les cellules et la qualité de cette étape a un fort impact sur l'habilité des cellules à se développer et à proliférer au contact de l'implant. La prolifération cellulaire évaluée *in vitro* par Wei *et al.* [146] s'est également révélée plus importante dans le cas des échantillons

microporeux, ce qui suggère que la microporosité facilite la migration des cellules et peut également promouvoir la prolifération cellulaire. Enfin, lors de cette étude, les observations MEB, effectuées après sept jours de culture, ont montré une bonne répartition des cellules à la surface des échantillons microporeux. Ces cellules étaient denses et liées les unes aux autres, formant ainsi des couches à l'intérieur des macropores de l'échantillon. Plus précisément, ces cellules étaient regroupées le long des parois des macropores et pénétraient profondément dans les échantillons contenant des micropores. De plus, l'activité ALP des ostéoblastes, mesurée après 7 jours de culture, était également plus élevée pour les échantillons microporeux, ce qui suggère une différenciation cellulaire promue par la présence de micropores.

Par ailleurs, des analyses histologiques réalisées par Lan Levengood *et al.* [149], après implantation de substituts en site osseux, ont montré la présence de cellules à l'intérieur de micropores mesurant quelques micromètres. Les micropores peuvent donc servir de sites d'accueil pour certaines cellules de petite taille.

Cependant, l'influence des micropores n'a pas toujours été notée comme bénéfique au comportement cellulaire. Ainsi, l'étude *in vitro* menée sur 3 semaines par Isaac *et al.* [144] sur des échantillons de β -TCP microporeux et non microporeux, avec des cellules stromales de moelle osseuse humaine, a montré une diminution de la viabilité des cellules avec la microporosité proportionnellement au temps d'incubation et une inhibition de la différenciation ostéoblastique en présence de micropores. Ces résultats viennent nuancer les conclusions précédentes quant à l'influence bénéfique de la microporosité sur le comportement cellulaire.

Le rôle des micropores sur le comportement des cellules reste mal connu. Il paraît donc difficile d'anticiper l'influence d'un type de microporosité, en termes de taux de microporosité, de répartition et de tailles de micropores, sur l'adhésion, la prolifération et la différenciation cellulaire. Cependant, les résultats rapportés par les différents auteurs cités précédemment, sur l'affinité des cellules pour la microporosité, sont encourageants pour le développement d'études biologiques visant à une meilleure compréhension du rôle de la microporosité.

I.4.3.4 Vascularisation

La présence de vaisseaux au sein d'un implant est nécessaire à la viabilité des tissus recolonisant ce dernier. En effet, comme précisé dans le paragraphe I.4.2, le métabolisme des cellules participant à la formation et au remodelage osseux est assuré par l'apport en nutriments et en oxygène au sein de l'implant. Les vaisseaux servent donc au transport de ces éléments à l'intérieur des implants ainsi qu'à l'évacuation des déchets.

L'étude d'Ohtsubo *et al.* [156], consistant à implanter en site osseux un greffon autogène d'os pariétal, un greffon d'os pariétal fritté et un implant synthétique en HA, a permis de montrer que la composition et la structure de l'implant affectaient non seulement la formation du nouveau tissu osseux mais également le phénomène d'angiogenèse lors de la cicatrisation. Cette étude a permis de confirmer les conclusions de précédentes études [157,158] et de suggérer, en particulier, que le ralentissement ou l'arrêt de l'angiogenèse dans le cas de l'implant synthétique était dû à la diminution de la quantité des facteurs de régulation de l'angiogenèse tels que le VEGF (facteur de croissance endothélial vasculaire). Lors d'études plus récentes, le phénomène de vascularisation a pu être observé au sein d'édifices macroporeux à parois microporeuses, suite à leur implantation en site osseux [149,159–162] ou non osseux [163]. De plus, les différences de pénétration capillaire mesurées par Hing *et al.* [159], dans les premiers instants suivant l'implantation en site osseux, suggèrent que le taux de développement du réseau vasculaire pourrait être lié aux variations de microporosité au sein de l'implant.

I.4.3.5 Fonctionnalisation

Afin de rendre un implant plus réactif par rapport à l'environnement biologique dans lequel il est placé, il est possible de fonctionnaliser sa surface. Cette méthode consiste à associer au matériau une biomolécule active ayant un rôle spécifique sur le comportement cellulaire.

Les structures macroporeuses interconnectées se sont révélées, à de nombreuses reprises, propices à la rétention et au relargage de biomolécules [161,164–166] telles que des facteurs de croissance, des protéines, des peptides, ou encore des antibiotiques.

L'adsorption et la libération de tels éléments par des implants synthétiques dépendent principalement des interactions chimiques et électrostatiques entre le matériau constituant l'implant et la molécule considérée. Mais l'environnement microstructural peut également affecter les phénomènes d'adsorption et de désorption.

La présence de micropores semble favoriser l'adsorption *in vivo* d'éléments endogènes à la surface des implants (paragraphe I.4.3.2). Cette capacité d'adsorption induite par la microporosité peut être exploitée pour améliorer la rétention de molécules au sein d'implants macroporeux et le relargage ultérieur de ces molécules dans l'organisme. En effet, la microporosité peut être envisagée comme réservoir de molécules bioactives [20] et semble susceptible de favoriser leur diffusion par la formation d'un trajet plus tortueux. Des implants macroporeux interconnectés possédant des micropores se sont ainsi révélés être de très bons supports pour l'introduction de molécules bioactives dans l'organisme [162,163,166–168]. Par exemple, Woodard *et al.* [163] ont implanté des échantillons d'HA macroporeux (250-350 μm) et des échantillons similaires contenant des micropores (2-8 μm) dans des muscles de cochon. Le facteur de croissance rhBMP-2 a été incorporé à tous les échantillons, *via* des microsphères de gélatine, avant leur implantation. La formation d'os a pu être observée, au bout de 8 semaines, au sein des implants micro-macroporeux et non au sein des implants macroporeux, montrant ainsi l'utilité des implants microporeux pour l'introduction de biomolécules dans l'organisme. Chai *et al.* [168] ont montré que la présence de micropores permettait une amélioration de la capacité d'adsorption d'antibiotiques à la surface d'HA et qu'elle permettait également une prolongation du relargage de ces biomolécules dans l'organisme. Enfin, selon les travaux réalisés par Polak *et al.* [162], la microporosité et la présence de BMP sembleraient influencer la formation osseuse de manières différentes et complémentaires et l'association de ces deux phénomènes pourrait engendrer une accélération considérable du processus de guérison osseuse.

Les différents travaux cités précédemment ont permis de mettre en évidence une influence positive de la microporosité pour la fonctionnalisation des implants par adsorption de molécules d'intérêt. Cependant, du fait de la faible liaison créée, cette méthode d'immobilisation ne permet pas un stockage à long terme de biomolécules et ne garantit pas le maintien de la fonctionnalité de la molécule lors de son adsorption puis de sa désorption. En revanche, l'immobilisation par greffage covalent fournit une plus grande stabilité de la molécule biologique, à plus long terme. Ce greffage permet également d'assurer la

fonctionnalité de la molécule à condition que les groupements participants à son activité ne soient pas impliqués dans le processus de greffage. Cette deuxième méthode de fonctionnalisation fait l'objet d'études sur les phosphates de calcium [70].

I.4.3.6 Conclusions sur la microstructure

Plusieurs études expérimentales, réalisées *in vitro* et *in vivo*, mettent en évidence l'influence bénéfique de la microporosité des implants sur la repousse osseuse. Bien que les mécanismes d'action de la microporosité n'aient, pour le moment, pas été clairement établis, des hypothèses ont pu être avancées sur le rôle de cette microporosité dans les phénomènes d'ostéoconduction et d'ostéoinduction. En effet, la microporosité semble favoriser le phénomène de dissolution-reprécipitation des phosphates de calcium, l'adsorption de matériel endogène à la surface de l'implant, l'adhésion, la prolifération et la différenciation cellulaires, ainsi que le phénomène de vascularisation. L'introduction de la microporosité au sein d'implants macroporeux paraît de ce fait souhaitable pour le développement de substituts osseux ostéoconducteurs et ostéoinducteurs. Enfin, les effets de la microporosité sur l'adsorption de matériel endogène et sur le comportement cellulaire permettent d'envisager le développement d'implants microporeux fonctionnalisés par des molécules bioactives.

I.4.4 Perspectives : implants macro-micro-poreux

Comme il a été décrit dans les paragraphes précédents, une macrostructure contrôlée des substituts, en termes de taux de porosité, de taille et de géométrie de pores et d'interconnexions, est nécessaire à la repousse osseuse au sein des implants. Des structures macroporeuses contrôlées avec un taux de porosité entre 40 % et 80 %, une taille de pores d'environ 300-600 μm , une géométrie de pores comprenant des concavités bien définies, des interconnectivités de diamètre supérieur à 100 μm , et incluant éventuellement des canaux, peut constituer un support souhaitable pour la régénération osseuse.

De plus, des études ont permis de montrer l'influence positive des micropores, au sein de ces structures macroporeuses, sur les phénomènes d'ostéoconduction et d'ostéoinduction. L'utilisation, en ingénierie tissulaire, de substituts macroporeux à parois microporeuses est donc actuellement envisagée en vue du comblement de grandes pertes de substance osseuse ou de la réparation de défauts osseux de taille critique. Le développement de tels implants

requiert un choix pertinent des méthodes de mises en forme, des études biologiques ainsi que des études de propriétés mécaniques de ces structures [10,169].

I.5 Mise en forme des implants poreux

I.5.1 Exigences de fabrication des implants

Outre le contrôle précis des paramètres architecturaux mentionnés au paragraphe I.4, de nombreuses exigences réduisent le choix de la méthode de mise en forme d'implants micro-macro-poreux d'architecture complexe tels qu'évoqués au paragraphe I.4.4.

Les principales exigences de fabrication de ces implants sont les suivantes [170] :

- Conservation des propriétés chimiques et de biocompatibilité du matériau ;
- Contrôle précis du taux, de la taille et de la morphologie des pores ;
- Maîtrise des propriétés mécaniques de la pièce ;
- Adaptabilité de la géométrie tridimensionnelle de l'implant au site d'implantation ;
- Reproductibilité ;
- Flexibilité de la méthode pour différents matériaux et différentes configurations.

Enfin, le coût et la durée de mise en forme doivent être pris en compte dans le choix de la méthode de fabrication.

I.5.2 Méthodes usuelles de mise en forme

Les principaux procédés de mise en forme de céramiques poreuses sont décrits dans l'étude bibliographique menée par Studart *et al.* [171]. Certains procédés usuels sont, en partie, manuels et présentent donc une mauvaise reproductibilité. Les méthodes nécessitant l'utilisation de répliques présentent des difficultés d'élaboration et d'élimination des préformes. L'utilisation de porogènes [172], quant à elle, peut susciter une densité de pores inégale en raison d'une dispersion non homogène des porogènes. Il en est de même pour la lixiviation de sels. De plus, le choix des géométries de pore est restreint par ces méthodes et l'agencement de ces pores est peu voire non contrôlé [173], conduisant parfois à des pores fermés non connectés (Figure 9-a). L'imprégnation de mousse conduit à des architectures tortueuses aléatoires non contrôlées (Figure 9-b). Enfin, les méthodes de type pressage

(uniaxial ou isostatique) et coulage ne permettent pas la mise en forme d'édifices poreux tridimensionnels d'architecture complexe.

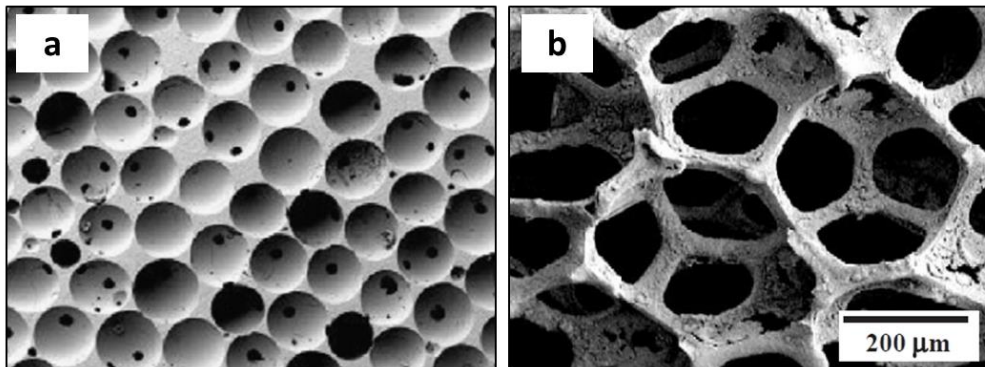


Figure 9 : Architectures poreuses en phosphates de calcium, mises en forme par méthodes usuelles avec des progènes [174] (a) et par imprégnation de mousses [175] (b)

Les techniques traditionnelles de mise en forme ne permettent pas l'obtention d'implants micro-macro-poreux à géométrie tridimensionnelle complexe en répondant à toutes les exigences de fabrication énumérées au paragraphe I.5.1. C'est la raison pour laquelle plusieurs auteurs [176] ont envisagé la fabrication additive [8] pour la production d'implants macroporeux ou macro-micro-poreux à architecture contrôlée [170]. Ces méthodes de fabrication additive sont utilisées pour la fabrication directe de substituts poreux ou pour une étape préalable de mise en forme de préformes [177].

I.5.3 Fabrication additive

Certaines techniques de fabrication additive peuvent être utilisées comme procédés de mise en forme. Elles permettent l'obtention de pièces tridimensionnelles de géométrie complexe sur mesure, à partir de données informatisées, sans faire intervenir de moule ni d'usinage.

Tout d'abord, un modèle numérique de l'objet à réaliser est élaboré par conception assistée par ordinateur (fichier CAO). Ce modèle tridimensionnel est ensuite coupé en sections parallèles bidimensionnelles d'épaisseur constante (fichiers STL), il s'agit du tranchage numérique. Enfin, ces fichiers sont envoyés à l'équipement de prototypage pour la mise en forme de l'objet 3D (Figure 10).



Figure 10 : Schéma de principe de fabrication additive

Ces méthodes présentent de nombreux avantages concernant la fabrication d'implants poreux [170] :

- obtention de géométries complexes adaptées à l'application visée,
- reproductibilité due à l'automatisation,
- haute résolution,
- contrôle précis des paramètres architecturaux,
- possibilité d'élaboration de structures anisotropes (gradient de taille de pores),
- couplage possible avec d'autres méthodes (solvants, porogènes).

Les méthodes de fabrication additive peuvent être classées en trois familles selon la forme initiale sous laquelle se présente le matériau : solide massif, poudre ou liquide (pâte ou suspension). La mise en forme d'objets 3D à partir d'un solide massif fait généralement appel à une étape d'usinage, telle que l'usinage rapide ou la découpe au fil chaud, qui ne permet pas l'obtention de géométries complexes à l'intérieur de la pièce. Les spécifications requises pour la mise en forme de substituts poreux à architecture contrôlée conduisent donc préférentiellement à la mise en forme de poudres, de pâtes ou de suspensions. Les procédés les plus utilisés en ingénierie des tissus osseux sont répertoriés dans le Tableau 9 (p. 62). Leur principe est décrit dans la suite de ce paragraphe. Toutes les techniques citées sont de type additives, c'est-à-dire que la construction de l'objet 3D s'effectue par ajout de matière, et plus précisément par addition de couches successives.

Le procédé **LOM** (*laminated object manufacturing* = découpe laser de feuillets) utilise la voie solide. Il consiste à la découpe laser de feuilles de matériau puis à l'empilement et au thermocollage de celles-ci [178]. Le rassemblement des couches peut se faire également par photopolymérisation UV, il s'agit alors de procédé **SFP** (*solid foil polymerisation* = polymérisation de feuilles solides) [179].

La mise en forme peut également s'effectuer directement à partir de poudres. En particulier, lors de la fabrication par **SLS** (*selective laser sintering* = frittage laser sélectif), un faisceau laser balaye la surface d'un lit de poudre, mélangée à un liant, pour la fritter de façon sélective afin de former une couche de matériau [180]. La poudre non frittée est ensuite éliminée par brossage et/ou soufflage. Cette technique est souvent utilisée avec des poudres de polymères [181] mais elle peut être également mise en œuvre à partir de mélanges de poudres polymère/céramique. Ainsi, Lee *et al.* ont pu réaliser, dès 1994, des implants poreux en phosphate de calcium par cette méthode [182]. D'autres implants en composite céramique/polymère ont pu être mis en forme par SLS lors de travaux plus récents [183]. Cette méthode est également utilisée pour la mise en forme de divers métaux et céramiques [184]. De même, le procédé **SLM** (*selective laser melting* = fusion sélective par faisceau laser) consiste à balayer la surface d'un lit de poudre de façon à la faire fondre pour former une couche de matériau. Cette variante du SLS est généralement utilisée pour la mise en forme de métaux [185] mais certains auteurs ont pu mettre en forme également des implants poreux en composite céramique/polymère par ce procédé [186]. Enfin, les poudres peuvent être fondues sous l'effet d'un faisceau d'électrons. C'est le cas du procédé **EBM** (*electron beam melting* = fusion par faisceau d'électrons) pour lequel le lit de poudre est irradié par un faisceau d'électrons sous vide. Ce procédé permet la fabrication de substituts en polymère, en céramique, en composite céramique/polymère, ainsi qu'en métal. Par exemple des implants en alliage de titane Ti6Al4V ont pu être récemment développés par cette méthode, avec une architecture en nids d'abeilles [187] ou d'autres architectures complexes [188]. La Figure 11 présente des photographies et des micrographies de pièces réalisées par SLS, SLM et EBM, issues de la littérature.

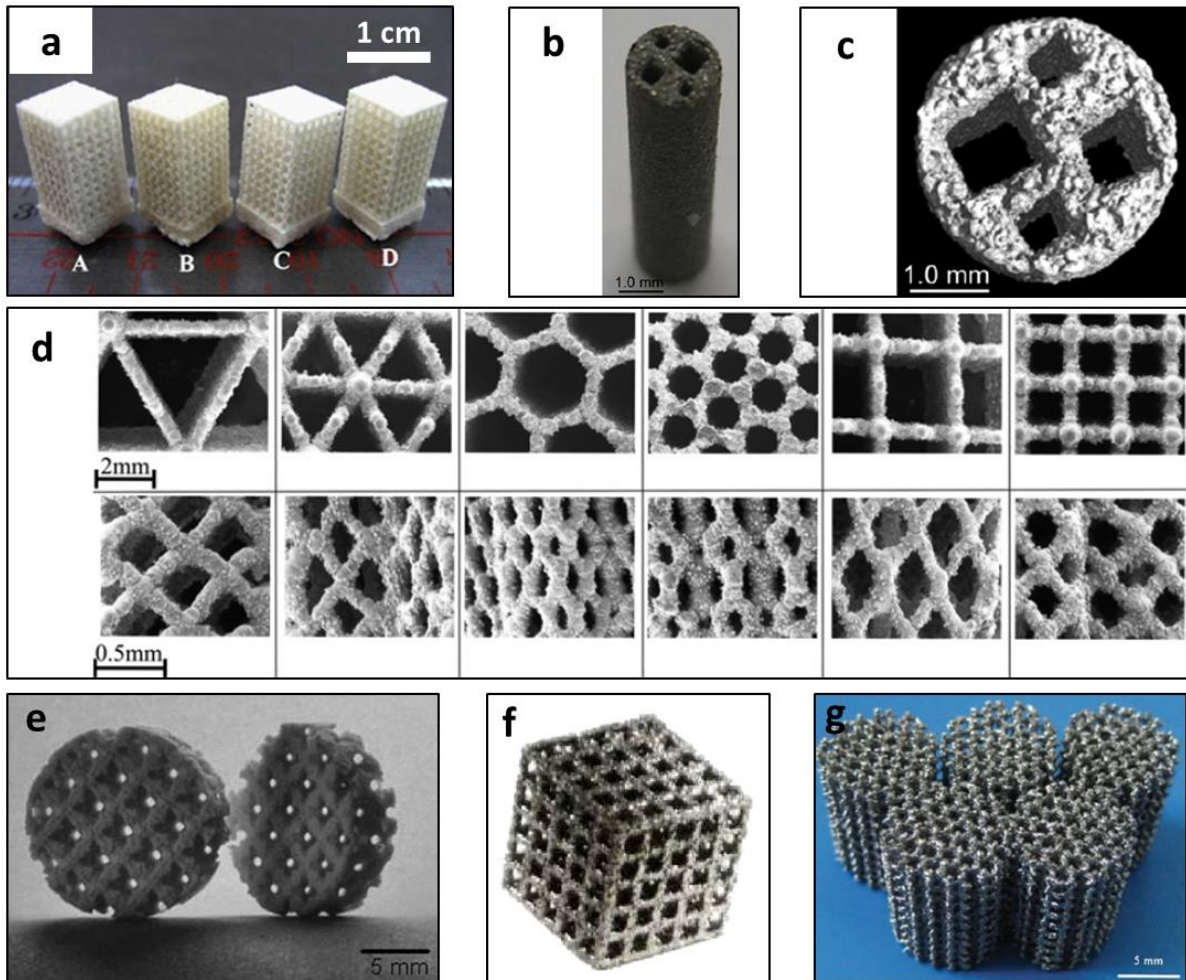


Figure 11 : Photographies et micrographies de pièces poreuses : (a) en polymère, en phosphate de calcium et en composite polymère/phosphate de calcium réalisées par SLS par Duan et al. [189] ; (b) (c) en titane réalisées par SLM par Fukuda et al. [112] ; (d) en alliage Ti-6Al-4V réalisées par SLM par Van Bael et al. [190] ; (e) en composite β -TCP-PDLLA (poly(D, L)-lactide) réalisées par SLM par Lindner et al. [186] ; (f) en alliage Ti-6Al-4V réalisées par EBM par Parthasarathy et al. [188] ; (g) en alliage Ti-6Al-4V réalisées par EBM par Li et al. [191]

De nombreuses méthodes, dites de dépôt robotique, font appel à l'éjection de matière liquide ou pâteuse. Ces techniques diffèrent entre elles par la forme de la matière éjectée (liquide, suspension, pâte plastique), la température, ou encore le mode d'éjection. Le procédé **FDM** (*fused deposition modeling* = dépôt de fil en fusion) consiste en un dépôt de fils de matière incandescente extrudée à travers une buse. La solidification de chaque couche se fait instantanément au contact de la précédente. Cette méthode a pu être utilisée pour la fabrication de préformes [192] mais également pour la mise en forme directe d'édifices

poreux en polymère [193] ou en céramique. De même, lors du procédé **3DPlot** (*threedimensional-plotting* = tracé tridimensionnel), un liquide ou une pâte est extrudé(e) à travers une tête mobile, à l'aide d'air comprimé. La tête d'extrusion est chauffée à la température requise. La solidification s'effectue également au contact de la couche précédente [178]. Dans le procédé **MJS** (*multiphase jet solidification* = solidification par jet multiphase), un mélange poudre-liant est chauffé et extrudé à travers une buse par un système de pompage. La buse balaye le plan horizontal pour y déposer la charge en fusion. Le liquide extrudé se colle à la couche précédente en la refondant partiellement [194]. Le procédé **ROD** (*robotic dispensing* = distribution robotique) fonctionne, quant à lui, par éjection d'une suspension dans un solvant pour induire une précipitation, puis par hydratation, congélation et lyophilisation. Cette méthode a permis la mise en forme d'implants en polymère et en composite polymère/céramique [195]. La Figure 12 présente des photographies et des micrographies de pièces réalisées par dépôt robotique, issues de la littérature.

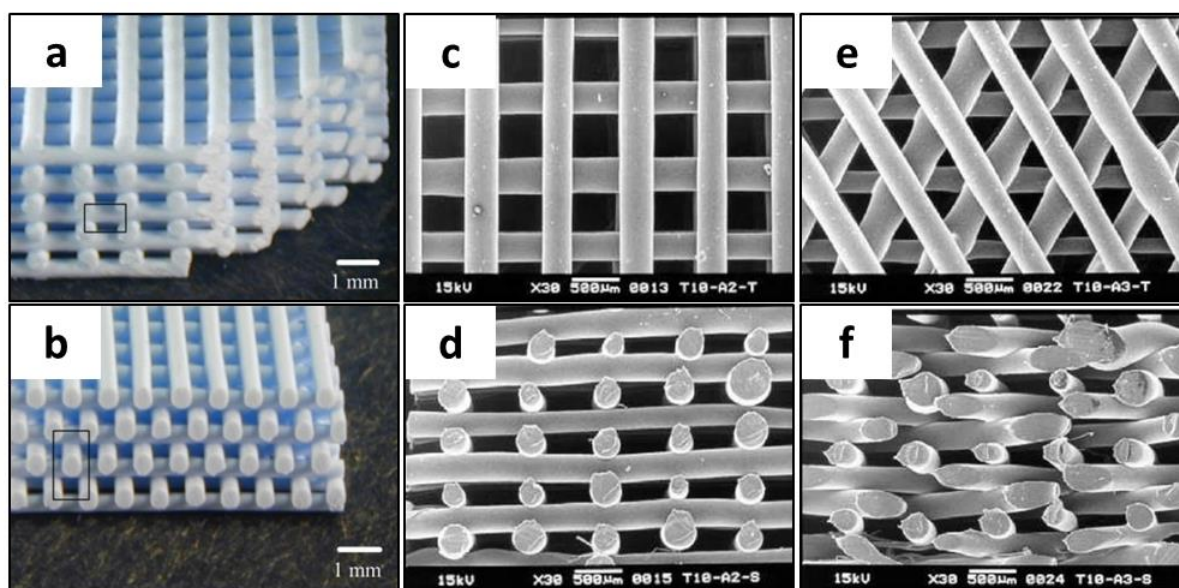


Figure 12 : Photographies et micrographies de pièces poreuses : (a) et (b) en HA réalisées par dépôt robotique par Dellinger et al. [196] ; (c) (d) (e) (f) en poly(ϵ -caprolactone) (PCL) réalisées par dépôt robotique (FDM) par Zein et al. [193]

Le procédé **3DP** (*threedimensional-printing* = impression tridimensionnelle), correspond à l'impression d'un liquide. Cette technique peut être appliquée à la mise en forme d'implants en polymère [197] ou bien en céramique [198,199] par impression de liant liquide sur de fines couches de poudre. Suite à l'impression de la totalité des couches, la poudre non

liée est éliminée. Une pièce poreuse en HA réalisée par Warnke *et al.* [199] est présentée en Figure 13.

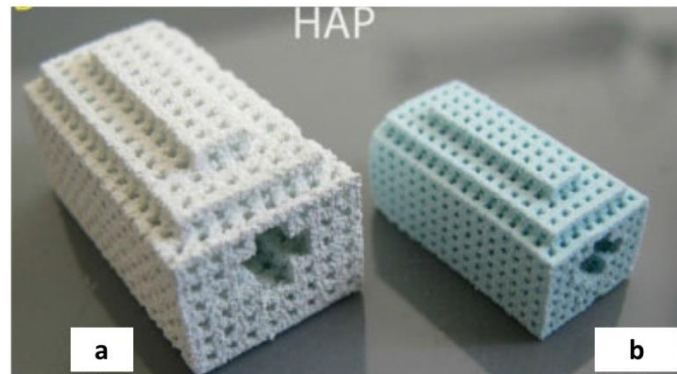


Figure 13 : Photographie de pièces poreuses en HA réalisées par 3DP par Warnke *et al.* [199] avant (a) puis après (b) frittage

Les procédés **SL** et **μSL** ((*micro*)*stereolithography* = (micro)stéréolithographie) consistent également au durcissement de pâtes ou de suspensions mais, dans ce cas, la mise en forme s'effectue par photopolymérisation sélective d'un monomère liquide photodurcissable contenant une charge pulvérulente céramique. Ces techniques sont très utilisées pour la mise en forme d'implants en polymère. En particulier Lee *et al.* ont utilisé la μSL pour la réalisation d'implants en polypropylène fumarate [200–203]. Cette technique permet également la fabrication d'implants composites polymère/céramique [204] et céramiques [205]. Des pièces trimimensionnelles d'architecture complexe, réalisées par SL et μSL sont présentées en Figure 14.

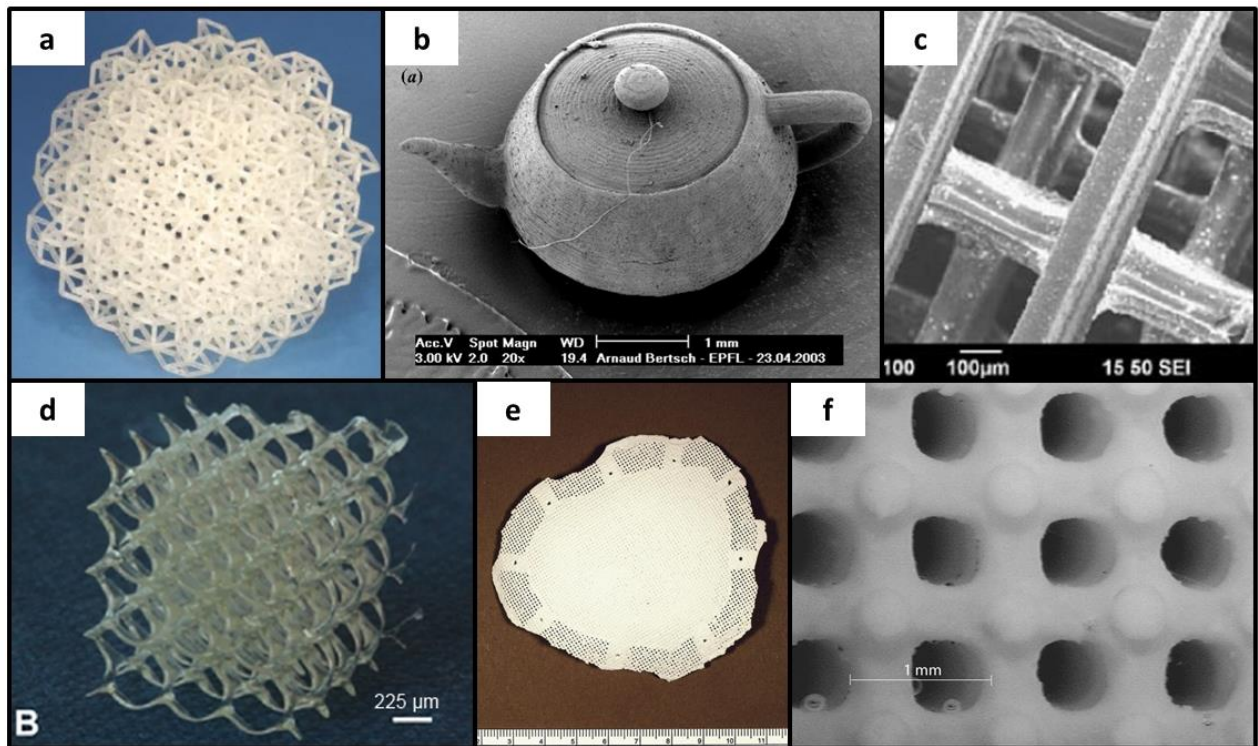


Figure 14 : Photographies et micrographies d'architectures complexes : (a) en polymère réalisée par SL par Man et al. [206], (b) en composite polymère-alumine réalisée par μ SL par Bertsch et al. [207], (c) en composite PPF/DEF-HA réalisée par μ SL par Lee et al. [208], (d) en polymère réalisée par μ SL par Leigh et al. [209] ; (e) (f) en HA réalisée par μ SL par Brie et al.[205]

La quasi-totalité des procédés de mise en forme décrits précédemment nécessite l'utilisation de liants organiques et conduit donc à des matériaux composites. Pour la production d'implants en céramique, une étape de déliantage est alors nécessaire, après mise en forme, afin d'éliminer la phase organique.

Procédé	Forme initiale du matériau	Avantages	Inconvénients
LOM	Solide massif	• Peu coûteux • Pas de réaction chimique • Vitesses de production élevées • Grande diversité des matériaux utilisés • Peu de contraintes internes ni déformations	• Peu précis dans la direction verticale • Difficulté de réalisation des liens entre les couches • Pauvres finitions de surface • Difficulté de production de pièces creuses
Solidification de poudres (SLS, SLM, EBM)	Poudre	• Porosité élevée • Rapport surface/volume élevé • Interconnexion complète • Contrôle de la macrostructure • Contrôle indépendant porosité/taille des pores • Pas de solvant • Bonnes propriétés mécaniques en compression • Pièces solides • Grande diversité des matériaux utilisés • Technologie simple • Finitions par fraisage pas nécessaires • Support non obligatoire	• Basse précision (> 0,1 mm dans les 3 directions) • Limitation à des pores de petite taille (100 µm) • Hautes températures • Aspect brut de surface en raison du durcissement de la poudre en périphérie → Surface brute granuleuse et poreuse • Faible dureté de surface des produits frittés
Ejection (FDM, 3DPlot, MJS, ROD)	Liquide, suspension, ou pâte plastique	• Peu coûteux • Porosité élevée • Rapport surface/volume élevé • Interconnexion complète • Contrôle de la macrostructure • Contrôle indépendant porosité/taille des pores • Pas de solvant • Bonnes propriétés mécaniques en compression • Pas de nettoyage, pas de gaspillage	• Hautes températures • Occlusion des pores aux frontières pour certaines méthodes • Faible diversité des matériaux utilisés • Précision restreinte à la taille du fil déposé (généralement autour de 1 mm) • Vitesse restreinte au débit de l'extrusion (selon la viscosité des pâtes) • Déformations et retraits difficilement prévisibles
3DP		• Technologie simple • Porosité élevée • Rapport surface/volume élevé • Interconnexion complète • Contrôle de la macrostructure • Contrôle indépendant porosité/taille des pores • Grande diversité des matériaux utilisés	• Limitation à des pores de petite taille (environ 100µm) • Mauvaise résistance mécanique • Solvants organiques toxiques • Coût élevé
SL		• Peu coûteux • Technologie simple • Bon état de surface, finitions par fraisage pas nécessaires • Pas de limitation dans la géométrie • Haute résolution (environ 100 µm) • Fonctionnement automatique en continu	• Précision verticale difficile à assurer • Utilisation de résines toxiques • Nécessité d'un nettoyage postérieur
µSL		• Peu coûteux • Technologie simple • Bon état de surface, finitions par fraisage pas nécessaires • Pas de limitation dans la géométrie • Très haute résolution (supérieure à SL : environ 10 µm) • Fonctionnement automatique en continu	• Précision verticale difficile à assurer • Utilisation de résines toxiques • Nécessité d'un nettoyage postérieur

Tableau 9 : Avantages et inconvénients des méthodes de fabrication additive utilisées en ingénierie tissulaire

Les principaux avantages et inconvénients des différentes méthodes décrites précédemment sont listés dans le Tableau 9. La méthode LOM permet la mise en forme de pièces compactes comportant des feuillets, de structure semblable à celle du bois, mais est difficilement applicable à la mise en forme de structures poreuses. Les méthodes par éjection ou extrusion, quant à elles, consistent à déposer des « lignes » de matière pâteuse. Ces méthodes sont donc limitées à la mise en forme d'empilements de lignes croisées et ne permettent donc pas l'obtention de structures plus complexes telles que des pores sphériques interconnectés. Enfin, la mise en forme à partir de poudres ne permet pas non plus la réalisation de macropores de grandes tailles, elle requiert l'utilisation de hautes températures et ne garantit pas une bonne maîtrise de l'état de surface et donc de la microstructure.

En revanche la stéréolithographie permet la mise en forme de pièces de géométrie complexe, de tailles de pores variées. Mais la résolution de cette méthode peut être insuffisante pour l'application visée. Par conséquent seule la microstéréolithographie, de principe similaire mais présentant une meilleure résolution, permet l'obtention d'implants susceptibles de correspondre au cahier des charges défini au paragraphe I.4.4. Le principe et les applications de ces deux dernières méthodes font l'objet du paragraphe suivant.

I.5.4 Stéréolithographie et microstéréolithographie

I.5.4.1 Stéréolithographie

La stéréolithographie est un procédé de fabrication couches par couches. Le modèle numérique de l'objet à réaliser est élaboré par conception assistée par ordinateur. Ce modèle tridimensionnel est coupé en sections parallèles bidimensionnelles d'épaisseur constante par tranchage numérique. Enfin, la mise en forme de l'objet s'effectue par empilements successifs des sections bidimensionnelles précédemment définies (Figure 15).

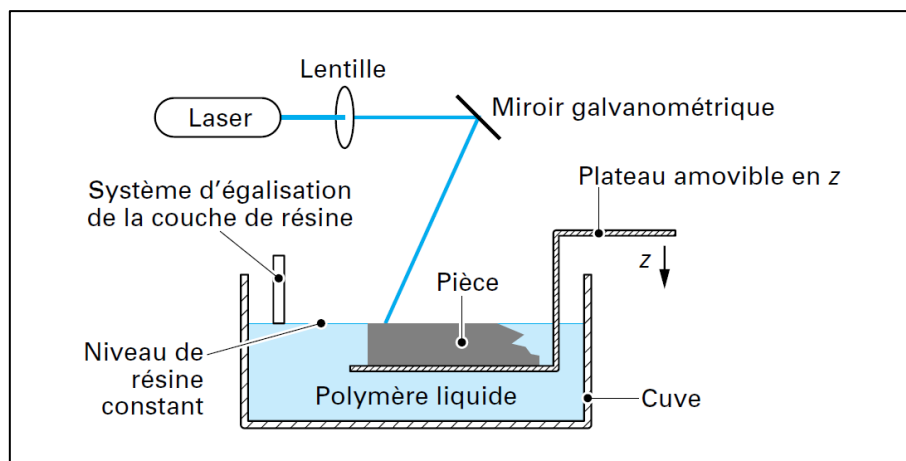


Figure 15 : Schéma de principe de stéréolithographie (BM7017²)

Le principe de mise en forme de la stéréolithographie repose sur la photopolymérisation, c'est-à-dire la polymérisation radicalaire initiée par l'absorption de photons. Cette réaction chimique permet la solidification d'un liquide par l'action de la lumière. Le mécanisme réactionnel de cette réaction chimique est composé de trois étapes successives : l'initiation, la propagation et la terminaison (AM3044³). L'initiation correspond à l'activation d'une molécule d'oligomère par un photoinitiateur. Ce dernier se décompose sous l'effet d'une irradiation UV pour générer des radicaux libres R réactifs avec les groupements fonctionnels de l'oligomère. Un de ces radicaux R se combine ensuite avec une molécule d'oligomère M pour former un nouveau radical RM. Suite à cette première étape d'amorçage, une réaction classique de polymérisation se déroule. La propagation démarre par l'ajout d'une autre molécule d'oligomère au radical RM et se poursuit par ajouts successifs de molécules à la chaîne polymérique croissante. Enfin, la terminaison correspond à l'arrêt de la croissance de cette chaîne de polymère. Les chaînes de polymères obtenues sont inférieures au micromètre. La photopolymérisation est quasi instantanée et ne nécessite pas un fort apport en énergie, contrairement à la polymérisation thermoamorcée. De plus, la réticulation ne se produit que sur les zones spatiales exposées au rayonnement lumineux, ce qui confère au procédé une bonne résolution. Cette dernière est cependant variable selon la diffusion de la lumière engendrée par le milieu réactionnel.

² Techniques de l'Ingénieur BM7017 : Prototypage rapide

³ Techniques de l'Ingénieur AM3044 : Polymérisation sous rayonnement UV

Le principe de mise en forme limite donc le procédé, *a priori*, à la fabrication d'objets en polymère. Cependant, des particules de céramique peuvent être introduites au sein des oligomères liquides, de façon à être piégées dans la matrice de polymère lors de la photopolymérisation. Cette matrice en polymère est alors brûlée afin de laisser un édifice architectural en céramique, qui est ensuite consolidé par frittage.

La précision maximale des machines de stéréolithographie est de l'ordre de 100 à 200 μm dans les trois directions de l'espace. Cette résolution est insuffisante pour l'application visée.

I.5.4.2 Microstéréolithographie

La mise en forme par microstéréolithographie repose sur le même principe que la stéréolithographie. Mais les équipements de microstéréolithographie permettent la fabrication de micro-objets avec une résolution de l'ordre de 10 μm dans les trois directions de l'espace (RE13⁴).

Deux types de procédés de microstéréolithographie sont décrits dans la littérature : l'écriture vectorielle et l'illumination intégrale. Dans le premier cas, la solidification d'une couche s'effectue par balayage vectoriel de la suspension photosensible par un faisceau très localisé. Dans le second cas, l'image bidimensionnelle entière est projetée sur la résine de façon à induire le durcissement global de chacune des couches. La seconde méthode, plus rapide que la première, est la plus répandue. Cette méthode est également appelée « microstéréolithographie à masque dynamique », en raison de l'utilisation de masques dynamiques électroniques reconfigurables.

⁴ Techniques de l'Ingénieur RE13 : Microstéréolithographie de pièces céramiques complexes

Les étapes de la microstéréolithographie à masque dynamique sont les suivantes :

- 1) Réalisation du dessin 3D de l'objet par CAO (fichier CAO)
- 2) Tranchage numérique du dessin 3D en N images 2D (N fichiers STL)
- 3) Dépôt d'une couche de suspension
- 4) Configuration du masque selon l'image 2D de la couche à réaliser
- 5) Projection de l'image sur la suspension par irradiation du masque
- 6) Répétition des étapes 3 à 5, N-1 fois, jusqu'à obtention de l'objet 3D
- 7) Nettoyage
- 8) Délantage
- 9) Frittage

La définition des géométries réalisées dépend à la fois de la résolution du procédé, directement liée à la qualité du masque, de l'architecture de l'objet à réaliser, et de la composition de la suspension photopolymérisable. De plus, pour une formulation de suspension donnée, la précision peut être optimisée par un choix judicieux des paramètres de mise en forme que sont l'épaisseur de couche, la vitesse d'étalement de la suspension et la durée d'exposition.

La suspension utilisée dans ce procédé doit être réactive. La réactivité peut être définie par la capacité du système à polymériser et peut être évaluée par l'énergie minimale à fournir au système pour déclencher la polymérisation. La suspension doit également être stable et homogène, de façon à obtenir une microstructure de l'objet régulière et à limiter les contraintes internes. Elle doit avoir un comportement rhéologique de type rhéofluidifiant à contrainte seuil d'écoulement et une faible viscosité, afin de faciliter son étalement. Enfin, la suspension doit comporter une charge élevée en céramique afin de garantir un faible retrait lors du traitement thermique et d'obtenir une densité élevée de l'objet, lui conférant ainsi de bonnes propriétés mécaniques.

Le point clef de la maîtrise du procédé en terme de définition des géométries formées est donc la formulation des suspensions. Ces dernières sont élaborées par compromis entre une réactivité élevée, un taux de charge élevé en poudre céramique et une viscosité faible. En effet, un taux de charge élevé entraîne une diminution de la réactivité de la suspension et une élévation de la viscosité.

I.5.5 Applications de la microstéréolithographie

L'utilisation de la μ SL pour la fabrication de pièces 3D à architecture complexe concerne plusieurs domaines d'applications. Différents travaux cités dans la littérature sont répertoriés dans le Tableau 10.

Référence	Méthode	Charge céramique	Déliantage/ Frittage	Nature du matériau final	Taille des pores
Zhang <i>et al.</i> [210]	Vectorielle	Alumine	600°C/1400°C	Céramique	Aucun
Bertsch <i>et al.</i> [207]	NC	Alumine	600°C/1600°C	Céramique	Aucun
Lee <i>et al.</i> [211]	Masque	Alumine-silice	Aucun/Aucun	Composite (polymère/céramique)	Aucun
Duterte <i>et al.</i> [212]	Masque	Alumine	400°C/1600°C	Céramique	Aucun
Miyamoto <i>et al.</i> [213]	Vectorielle	Alumine-zircone et alumine-silice	NC/1600°C	Céramique	Aucun
Lee <i>et al.</i> [214]	Vectorielle	Aucune	Aucun/Aucun	Polymère	249 – 260 μ m
Chartier <i>et al.</i> [215]	Masque	Alumine	500°C/1650°C	Céramique	Aucun
Lee <i>et al.</i> [204]	Vectorielle	HA	Aucun/Aucun	Composite (polymère/céramique)	330 – 360 μ m
Choi <i>et al.</i> [203]	Masque	Aucune	Aucun/Aucun	Polymère	100 μ m
Yang <i>et al.</i> [216]	Masque	Aucune	Aucun/Aucun	Polymère	Aucun
Seol <i>et al.</i> [217]	Masque	HA et TCP	Aucun/1400°C et Aucun/Aucun	Céramique et composite (polymère/céramique)	< 500 μ m

Tableau 10 : Utilisations de la μ SL dans la littérature (NC : non communiqué)

Parmi les utilisations de la μ SL, peu concernent la fabrication d'édifices poreux tridimensionnels. De plus, ce procédé de mise en forme commence à peine à être étudié pour des applications dans le domaine de l'ingénierie des tissus osseux et les principaux implants développés par cette méthode sont en polymère ou en composite polymère/céramique. La fabrication d'édifices poreux en céramique par ce procédé constitue donc une approche innovante dans le domaine des biomatériaux.

I.6 Conclusion du chapitre I

La première partie de ce chapitre bibliographique a permis la mise en évidence de la biocompatibilité, de la bioactivité et de la faculté de fonctionnalisation de l'hydroxyapatite silicatée. Ces caractéristiques en font un matériau d'intérêt pour la substitution osseuse. De plus, la maîtrise de la synthèse de ce matériau au sein du laboratoire SPCTS, permet d'orienter le choix du matériau vers ce dernier.

Dans la seconde partie de ce chapitre, a été mise en exergue la nécessité d'une macrostructure contrôlée des substituts, en termes de taux de porosité, de taille et de géométrie de pores et d'interconnexions, pour la repousse osseuse au sein des implants. L'influence positive des micropores, au sein de ces structures macroporeuses, sur les phénomènes d'ostéoconduction et d'ostéoinduction, a également été montrée. Ces éléments conduisent donc à envisager le développement de substituts macroporeux à parois microporeuses, d'architecture complexe, en vue du comblement de défauts osseux de taille critique.

Enfin, les exigences de mise en forme d'implants poreux en céramique à architecture complexe adaptée, et éventuellement sur mesure, ont été précisées. La comparaison de diverses méthodes de fabrication additive permet de sélectionner la microstéréolithographie comme le procédé le plus adapté à la fabrication de tels implants, en raison de la complexité des géométries souhaitées et de la précision requise.

L'étude et la stratégie expérimentales présentées dans le chapitre suivant reposent sur ces éléments bibliographiques. Il est consacré à la synthèse du matériau SiHA, au développement de suspensions adaptées au procédé, et à la mise en forme de substrats céramiques macro-micro-poreux. Les supports ainsi élaborés doivent posséder des macropores de plus de 300 μm de tailles et de géométries diverses, avec différents taux de microporosité ouverte, afin de servir de supports aux études biologiques ultérieures. Enfin, le dernier chapitre est dédié à l'évaluation biologique du matériau et à l'étude préliminaire de l'influence de la macroporosité, en termes de taille et de géométrie, sur le comportement cellulaire et la vascularisation.

Chapitre II – Matériau et mise en forme

II.1 Introduction

L'objectif principal du travail présenté dans ce chapitre est la mise en forme de substrats céramiques d'architecture modèle en hydroxyapatite silicatée SiHA possédant des macropores de plus de 300 μm de différentes tailles et différentes géométries, avec différents taux de microporosité ouverte. En particulier, les géométries élaborées doivent posséder des angles de tailles différentes afin de pouvoir évaluer l'effet de la présence de ces angles sur le comportement cellulaire. De plus, les macropores doivent être totalement traversants afin de permettre le passage des vaisseaux au sein de ceux-ci.

La première partie de ce chapitre décrit les méthodes de synthèse et de caractérisation du matériau. L'élaboration des suspensions est détaillée dans une seconde partie. La mise en forme et le contrôle de la macroporosité par microstéréolithographie sont développés dans une troisième partie. Enfin, l'étude du frittage des échantillons, conduisant à la maîtrise du taux de microporosité ouverte, est décrite dans la dernière.

II.2 Synthèse et caractérisation des poudres HA et SiHA

Des poudres d'hydroxyapatite silicatée, de formule chimique $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{SiO}_4)_x(\text{OH})_{2-x}$, sont utilisées pour la mise en forme d'échantillons macro-microporeux par microstéréolithographie. Le taux de substitution est choisi de façon à impacter la réponse biologique, tout en conservant un matériau monophasé suite à un frittage densifiant. D'après l'étude bibliographique présentée au paragraphe I.3.2, les taux de substitutions semblant présenter un intérêt biologique sont compris entre 0,8 % et 2,2 % massique, ce qui correspond à l'intervalle de moles de silicium suivant : $0,255 \leq x \leq 0,750$ (Figure 2-b, p 19). Les courbes de décomposition thermique et de taux de densification maximum, observées dans la littérature, permettent de fixer le taux de substitution limite permettant un compromis matériau monophasé/densification maximale, à $x = 0,5$ mol [48,83]. Sur ces bases et afin de s'assurer de l'obtention de matériaux monophasés, dans une large gamme de paramètres de

frittage, le taux de substitution est fixé à $x = 0,4$ mol pour la présente étude, soit une formule chimique type de l'hydroxyapatite silicatée $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{5,6}(\text{SiO}_4)_{0,4}(\text{OH})_{1,6}$ (notée SiHA par la suite). L'hydroxyapatite phosphocalcique, de formule chimique $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, est considéré comme matériau de référence pour les études biologiques. Sa synthèse et ses caractéristiques sont également brièvement décrites.

Les poudres d'hydroxyapatite HA et d'hydroxyapatite silicatée SiHA sont synthétisées par précipitation en voie aqueuse selon un protocole élaboré au sein du laboratoire SPCTS [77,82,218,219]. La précipitation est réalisée par introduction d'une solution phosphatée, en présence ou non d'un précurseur de silicium, dans un réacteur contenant une solution de calcium. Les précurseurs utilisés sont les suivants (fiches de spécification en annexe I) :

- Le nitrate de calcium tétrahydrate $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Sigma Aldrich, 237124, pureté : 99 %) ;
- L'hydrogénophosphate de diammonium $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Fisher, A/5360/53, pureté : 99 %) ;
- Le tétraacétate de silicium $\text{Si}(\text{OCOCH}_3)_4$ (Sigma Aldrich, 345156, pureté : 98 %).

Le nitrate de calcium tétrahydraté et l'hydrogénophosphate de diammonium sont directement dissous en milieu aqueux. La mise en suspension de la poudre de tétraacétate de silicium nécessite un broyage préalable en milieu aqueux au mélangeur planétaire (Pulvérisette 6, Fritsch) à 150 tr.min^{-1} pendant 1 min, dans une jarre en alumine de 250 mL contenant quatre billes de broyage en alumine de diamètre 15 mm. La solution contenant le silicium est ensuite ajoutée à la solution phosphatée dans le cas de l'hydroxyapatite silicatée. Le nombre de moles des réactifs est défini de façon à obtenir un rapport molaire Ca/P ou Ca/(P+Si) constant et égal à 10/6 afin de respecter les formules hypothétiques : $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ dans le cas de HA et $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{5,6}(\text{SiO}_4)_{0,4}(\text{OH})_{1,6}$ pour SiHA.

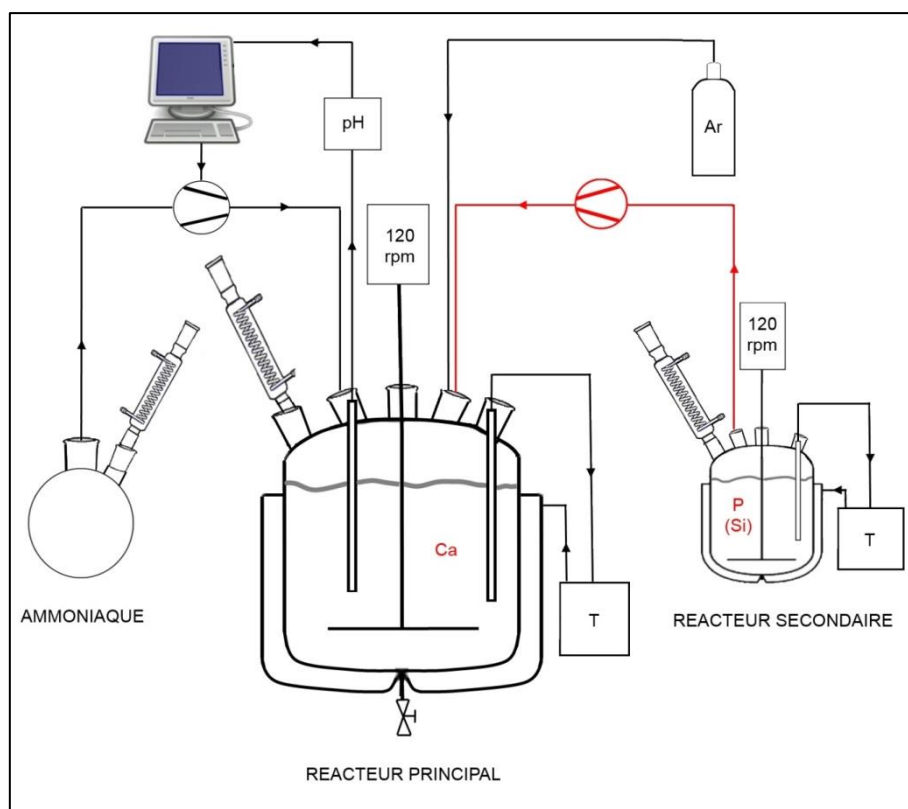


Figure 16 : Schéma du montage de synthèse des poudres HA ou SiHA

Le montage (Figure 16) est composé d'un réacteur principal d'une capacité de 10 L, contenant 2,0 L de solution de nitrate de calcium et d'un réacteur secondaire contenant 1,2 L de solution de phosphate ou de phosphate et silicium. Ces deux réacteurs sont équipés d'une double paroi permettant la circulation d'une huile chauffée à la température souhaitée par le biais d'un bain thermostaté (Phoenix II, Thermo Scientific). L'ensemble du dispositif est piloté par ordinateur à l'aide d'un programme développé sous Labview® (National Instruments) (régulation et acquisition des données paramétriques). Les réacteurs, principal et secondaire, sont maintenus respectivement aux températures de $90,0 \pm 4,0^{\circ}\text{C}$ et $60,0 \pm 4,0^{\circ}\text{C}$ pendant toute la durée de la synthèse. Les solutions présentes dans les réacteurs sont soumises en continu à une agitation mécanique à 120 tr/min (RZR 2102 Control, Heidolph). Le pH du milieu réactionnel, au sein du réacteur principal, est maintenu à $9,0 \pm 0,1$ par ajouts automatiques d'une solution d'ammoniaque NH_4OH (Merck) (Annexe I), à l'aide d'une pompe doseuse (Pompe gamma/L, ProMinent). La solution de phosphate, ou phosphate et silicium, est progressivement ajoutée à la solution de nitrate de calcium, dans le réacteur principal, à l'aide d'une pompe péristaltique à la vitesse de $2,4 \text{ L.h}^{-1}$ (Pumpdrive 5206). Après ajout complet de la solution dans le réacteur principal, le mélange est maintenu sous agitation

mécanique à 120 tr/min pendant 15 min. Le pH et la température du milieu réactionnel sont respectivement maintenus à $9,0 \pm 0,1$ et $90,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ pendant cette période de maturation. Le réacteur principal est placé sous balayage d'argon au débit de 30 L.h^{-1} , afin d'éviter une éventuelle carbonatation des produits de synthèse. Enfin, les gaz émis durant la synthèse sont condensés à l'aide de colonnes à reflux placées au-dessus des réacteurs.

La suspension obtenue après maturation est centrifugée (IEC CL40 Centrifuge, Thermo Scientific) à 1500 tr/min pendant 5 min, afin d'en extraire le précipité. Ce dernier est rincé deux fois à l'eau distillée puis centrifugé à nouveau dans les mêmes conditions. Le précipité est ensuite séché dans une étuve ventilée (Mettler) à 100°C pendant 24 h. Enfin, la poudre sèche agglomérée est broyée manuellement et grossièrement au mortier en agate.

Un traitement thermique des poudres brutes de SiHA, à une température supérieure à 1000°C , est nécessaire pour assurer l'incorporation totale du silicium au sein de la structure apatitique [48,77,82]. La pureté de la phase obtenue après calcination est contrôlée suivant la norme internationale ISO 13779-3⁵. Un échantillon de poudre brute est calciné sous air à 1000°C pendant 15 h, avec une rampe de montée en température de 20°C/min , dans un four Super Kanthal. L'absence de toute autre phase secondaire, sur les poudres calcinées à 1000°C pendant 15 h, est vérifiée par diffraction des rayons X (DRX) et spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF), selon les conditions décrites en annexe II. Les diffractogrammes de poudres HA et SiHA calcinées à 1000°C pendant 15 h sont présentés en Figure 17. Aucune phase secondaire cristalline n'est observée. Tous les pics de diffraction sont indexés en accord avec la fiche PDF 9-432 de l'apatite. Les spectres IRTF de ces mêmes poudres sont donnés à la Figure 18, dont un agrandissement est présenté en Figure 19. Les bandes d'absorption infrarouge observées sur les spectres de l'HA, répertoriées dans le Tableau 11, correspondent aux vibrations des groupements phosphates et hydroxydes de l'HA [220]. Ces bandes d'absorption infrarouge sont également observées sur les spectres des SiHA, avec cependant une diminution de l'intensité relative de certaines bandes. Ces derniers contiennent également des bandes spécifiques aux groupements silicates (Tableau 11). En particulier, les bandes à 504 , 752 et 890 cm^{-1} et l'épaule à 522 cm^{-1} , indexées en Figure 19, sont attribuées aux vibrations des liaisons Si-O des groupements silicates présents dans la

⁵ ISO 13779-3 : 2008 : Implants chirurgicaux – Hydroxyapatite – Partie 3 : Analyse chimique et caractérisation de la cristallinité et de la pureté de phase

structure apatitique [82,221]. De plus, les légers épaulements, observés à 840, 928, 945 et 984 cm^{-1} , peuvent être attribués également aux groupements silicates [46,78,221], ou bien aux vibrations des liaisons Si-OH présentes en surface de SiHA [78]. Enfin, un épaulement supplémentaire à 1000 cm^{-1} est détectable sur les spectres de SiHA. Il peut être attribué, selon Marchat *et al.* [78], à la dégénérescence du mode de vibration ν_3 des groupements phosphate due à la présence de groupements silicate sur certains sites de phosphate. Aucune bande correspondant aux liaisons Si-O de silice amorphe (à environ 873, 798, 683, 535 et 515 cm^{-1}), n'apparaît dans les spectres des SiHA [78].

La teneur en silicium des poudres a été mesurée par ICP/AES (*Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy*), après dissolution de 0,1 g d'une poudre calcinée dans une solution acide préparée avec 4 ml de HNO_3 et de 10 ml de HF. La valeur obtenue est de $0,42 \pm 0,05$ mol.

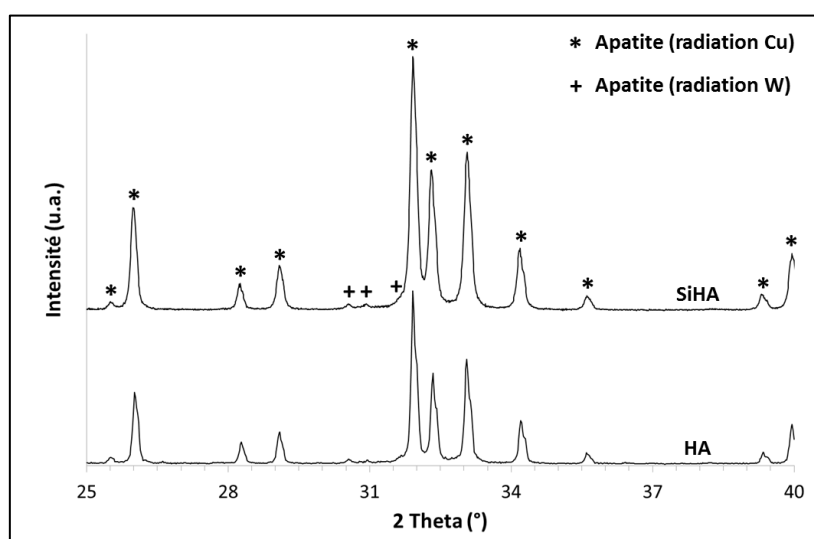


Figure 17 : Diffractogrammes de poudres HA et SiHA calcinées à 1000°C pendant 15 h, indexés selon la fiche PDF 9-432 avec les radiations du cuivre et du tungstène

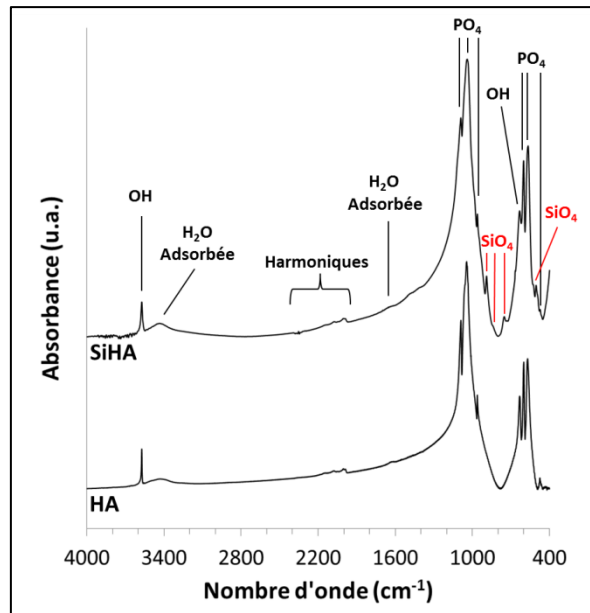


Figure 18 : Spectres infrarouge de poudres HA et SiHA calcinées à 1000°C pendant 15 h

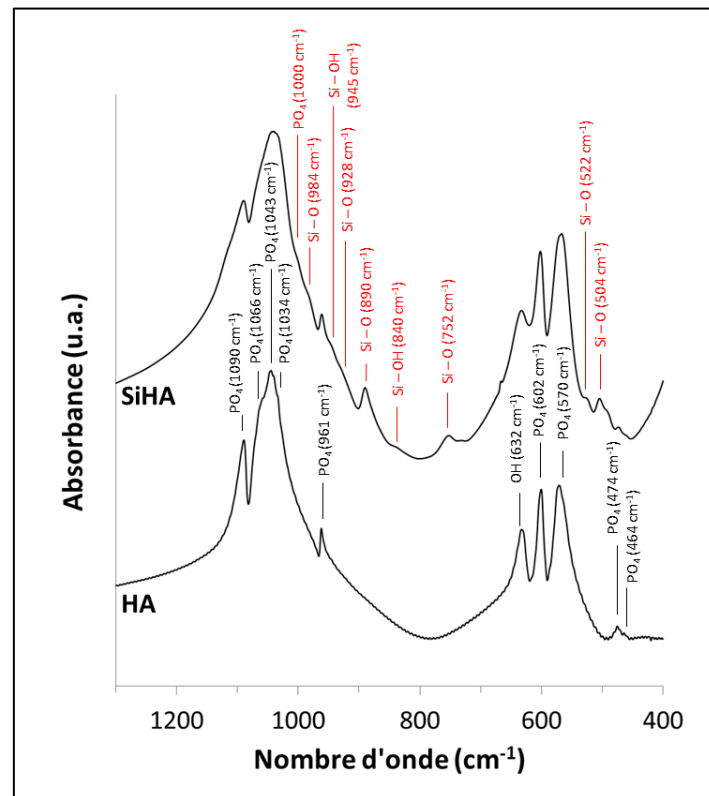


Figure 19 : Spectres infrarouge de poudres HA et SiHA calcinées à 1000°C pendant 15 h, agrandissement sur la zone spectrale 400-1300 cm^{-1} (les indexations représentées en noir sont communes aux spectres d'HA et SiHA, les indexations représentées en rouge sont spécifiques aux spectres de SiHA)

Bandes d'absorption (cm ⁻¹) communes à HA et SiHA	Mode	Bandes d'absorption (cm ⁻¹) spécifiques à SiHA	Mode
464 (épaulement)	$\nu_2(\text{PO}_4)$	504	Vibration SiO_4
474	$\nu_2(\text{PO}_4)$	522 (épaulement)	Vibration SiO_4
570	$\nu_4(\text{PO}_4)$	752	Vibration SiO_4
602	$\nu_4(\text{PO}_4)$	840 (épaulement)	Vibration SiO_4 ou Si-OH
632	$\nu_L(\text{OH})$	890	Vibration SiO_4
961	$\nu_1(\text{PO}_4)$	928 (épaulement)	Vibration SiO_4
1034 (épaulement)	$\nu_3(\text{PO}_4)$	945 (épaulement)	Vibration SiO_4 ou Si-OH
1043	$\nu_3(\text{PO}_4)$	984 (épaulement)	Vibration SiO_4 ou Si-OH
1066 (épaulement)	$\nu_3(\text{PO}_4)$	1000 (épaulement)	$\nu_3(\text{PO}_4)$ (dégénérescence)
1090	$\nu_3(\text{PO}_4)$		
1640	$\delta(\text{H}_2\text{O})$ (adsorbée)		
3000-3700	$\nu(\text{H}_2\text{O})$ (adsorbée)		
3573	$\nu_s(\text{OH})$		

Tableau 11 : Bandes d'absorption observées sur les spectres IRTF des poudres HA et SiHA calcinées à 1000°C pendant 15 h [220]

Les poudres brutes présentent une surface spécifique de $66 \pm 3 \text{ m}^2/\text{g}$ (moyenne des valeurs obtenues dans les conditions décrites en annexe III, pour douze synthèses). La masse volumique de la poudre brute, obtenue par pycnométrie à hélium selon les conditions décrites en annexe IV.1, et moyennée sur douze synthèses, est de $2,9 \pm 0,1 \text{ g/cm}^3$. Cette valeur est inférieure à la masse volumique théorique ($3,119 \text{ g/cm}^3$) calculée à partir des affinements de paramètres de maille d'une poudre de même composition chimique traitée thermiquement à 1000°C pendant 15 h [82]. Une micrographie MEB de la poudre brute est présentée en Figure 20.

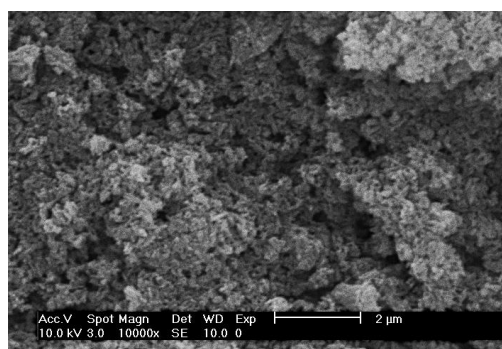


Figure 20 : Micrographie MEB de la poudre de SiHA brute

II.3 Microstéréolithographie : principe et montage expérimental

II.3.1 Microstéréolithographie : principe

La mise en forme par microstéréolithographie consiste à photopolymériser une suspension photosensible chargée de particules céramiques, au contact d'un faisceau ultraviolet (UV), puis à traiter thermiquement l'objet composite créé pour obtenir un objet céramique. La fabrication de pièces céramiques tridimensionnelles (3D) nécessite donc la mise au point de trois étapes principales (Figure 21) que sont la mise en suspension, la mise en forme et le traitement thermique.

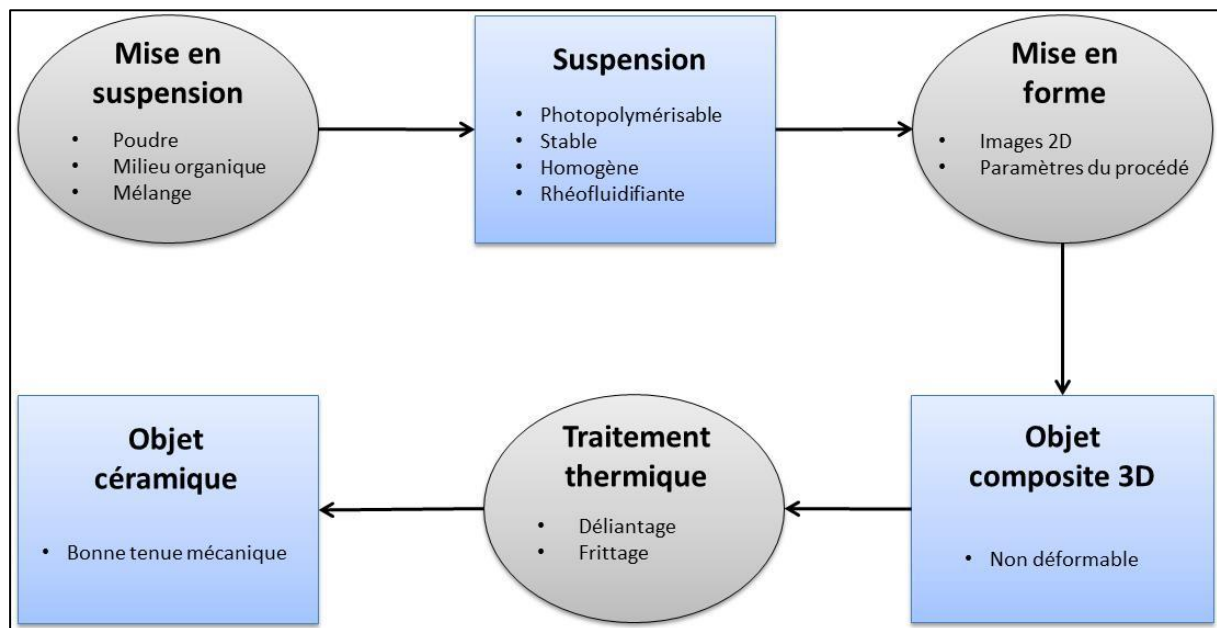


Figure 21 : Etapes de développement d'un objet céramique 3D par microstéréolithographie

Les interactions entre des résines photopolymérisables non chargées en poudre céramique et le faisceau UV provoquent une diminution exponentielle de la densité d'énergie qui peut être décrite par la loi de Beer-Lambert-Bouguer (Équation 8).

$$E = E_i \cdot \exp(-\alpha z)$$

Équation 8 : Loi de Beer-Lambert-Bouguer

Cette loi relie la densité d'énergie E reçue à travers un milieu d'épaisseur z et de coefficient d'extinction α , à la densité d'énergie du faisceau incident E_i . Dans le cas de la photopolymérisation, la loi de Beer-Lambert-Bouguer modifiée (Équation 9) peut être utilisée pour exprimer l'épaisseur polymérisée Cd en fonction de la densité d'énergie critique E_c nécessaire pour la photopolymérisation (Équation 10).

$$z = \frac{1}{\alpha} \cdot \ln\left(\frac{E_i}{E_c}\right)$$

Équation 9 : Loi de Beer-Lambert-Bouguer modifiée

$$Cd = \frac{1}{\alpha} \cdot \ln\left(\frac{E_i}{E_c}\right)$$

Équation 10 : Equation reliant E_c et Cd

Dans le cas de suspensions chargées, la présence de particules céramiques non réactives provoque un phénomène supplémentaire de diffusion du faisceau qui affecte l'épaisseur polymérisée et la résolution. L'influence de ce phénomène sur l'épaisseur polymérisée peut être prise en compte par un facteur D_p défini comme la profondeur de pénétration du faisceau. L'épaisseur de polymérisation Cd peut donc être reliée à la densité d'énergie du faisceau incident E_i , à la densité d'énergie critique E_c et à la profondeur de pénétration du faisceau D_p , par l'équation de Jacobs (Équation 11) [222,223] qui découle de la loi de Beer-Lambert-Bouguer.

$$Cd = D_p \cdot \ln\left(\frac{E_i}{E_c}\right)$$

Équation 11 : Equation de Jacobs

II.3.2 Microstéréolithographie : montage expérimental

Le procédé de microstéréolithographie utilisé dans cette étude est de type projection à masque dynamique. Cette technique repose sur l'illumination intégrale d'un motif sur la surface d'une suspension photopolymérisable. L'échantillon est fabriqué couche par couche, par polymérisation globale de chacune des couches, engendrée par la projection d'une image bidimensionnelle (2D) intégrale sur la surface libre de la suspension photopolymérisable.

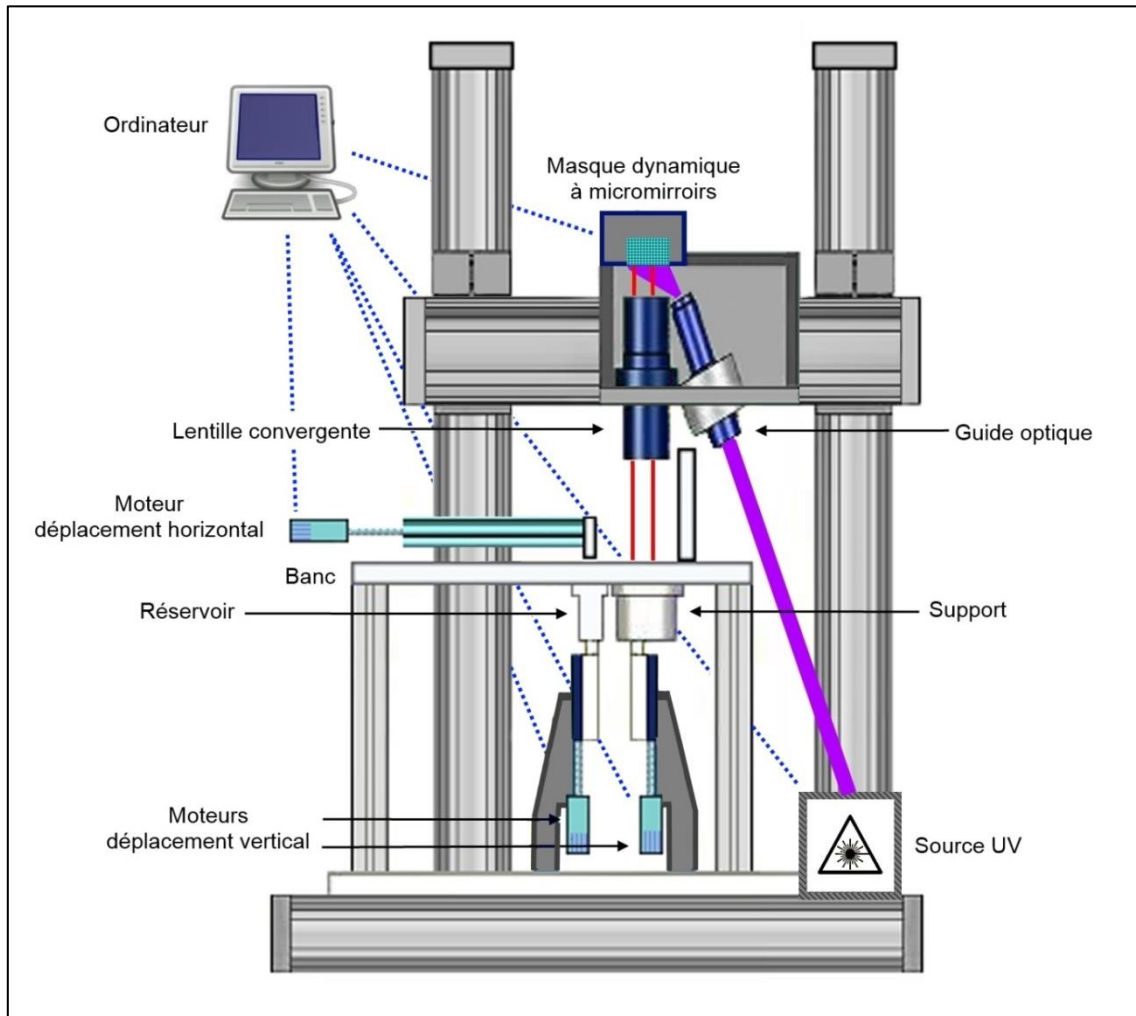
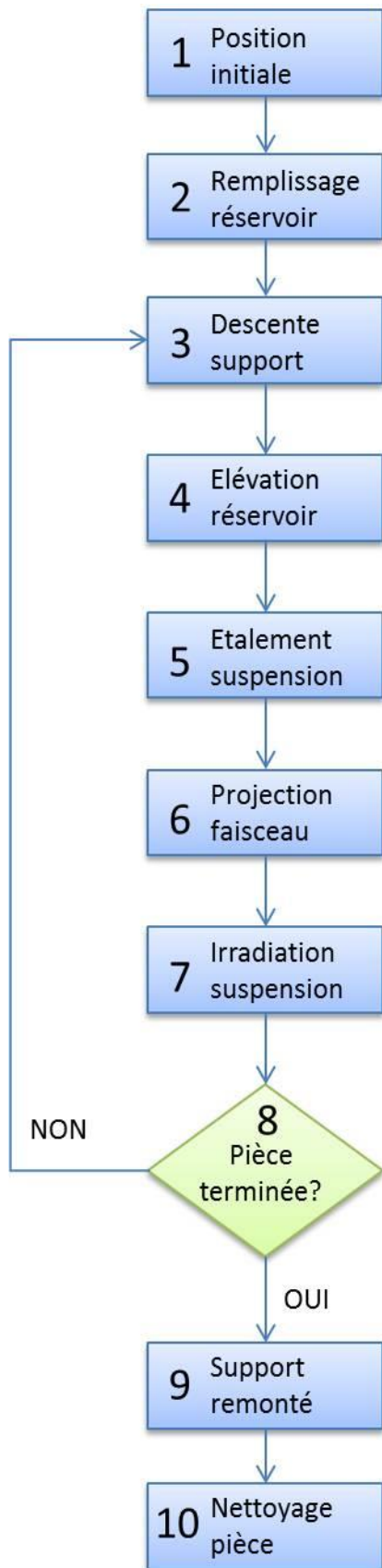


Figure 22 : Schéma du montage de microstéréolithographie

Le schéma du montage de microstéréolithographie utilisé est présenté en Figure 22. Les étapes permettant la mise en forme d'une pièce à n couches sont listées et décrites dans la Figure 23 et illustrées en Figure 24.



1- La surface du support est initialement réglée au niveau de la surface du banc et le racleur est situé en position initiale derrière le réservoir.

2- Le réservoir est rempli de suspension.

3- Le support est descendu d'une hauteur égale à l'épaisseur choisie pour la couche à traiter (Figure 24-1).

4- Le réservoir est élevé pour fournir la suspension au niveau du banc.

5- La suspension est étalée sur le support par le racleur, lui-même déplacé le long du banc par un moteur horizontal. Le racleur est ensuite relevé et ramené en position initiale. La suspension se stabilise sur le support pendant une durée appelée « temps de stabilisation » (Figure 24-2).

6- Un faisceau UV ($\lambda=365$ nm) de section carrée faiblement divergent est émis par une source UV équipée d'une lampe Hg-Xe (LC 8 Hamamatsu), pendant une durée souhaitée appelée « temps d'exposition ». Ce faisceau est projeté, à travers un guide optique, sur un masque dynamique composé de 1024×768 micromiroirs de $14 \mu\text{m}$ de côté.

7- Chaque micromiroir est incliné de $\pm 12^\circ$ de façon à orienter une partie du faisceau vers la zone de suspension destinée à être irradiée. La partie du faisceau projetée sur les miroirs inclinés à $+12^\circ$ est réfléchiée en direction du support contenant la suspension, à travers une lentille convergente (Figure 25- a). En revanche, la partie du faisceau projetée sur les miroirs inclinés à -12° est redirigée hors du plan de travail (Figure 25- b).

8- Les étapes 3 à 7 sont renouvelées n-1 fois.

9- Le support est remonté au niveau du banc.

10- La pièce est détachée du support et nettoyée.

Figure 23 : Diagramme de mise en forme d'un objet 3D par microstéréolithographie à masque dynamique

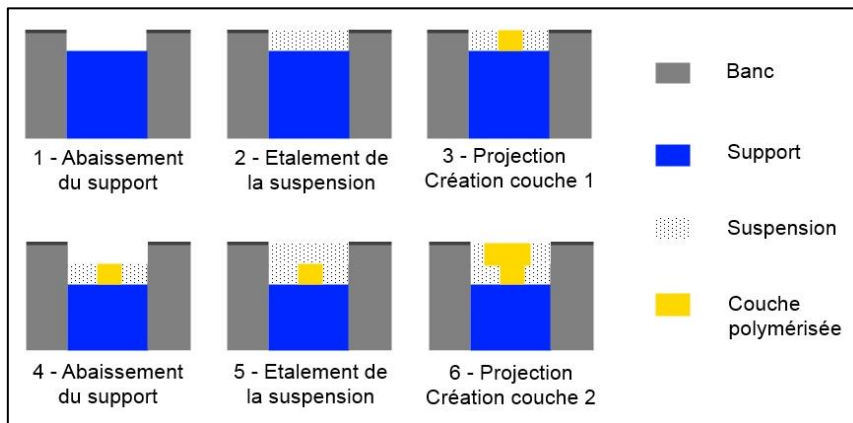


Figure 24 : Etapes de mise en forme d'une pièce 3D par microstéréolithographie (création des deux premières couches)

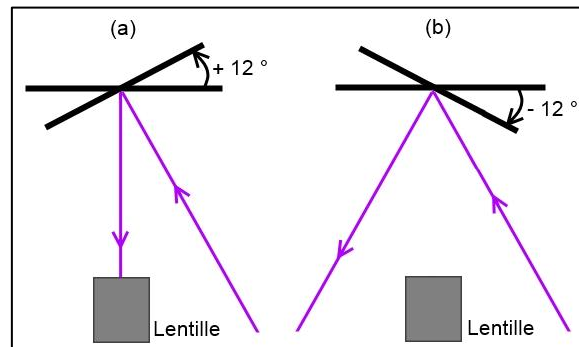


Figure 25 : Réflexion du faisceau UV sur les micromiroirs, en direction de la lentille (a) et hors du plan de travail (b)

L'activation de la source UV, le pilotage des moteurs ainsi que la configuration des micromiroirs sont contrôlés par un programme développé sous Labview® (National Instruments).

Le montage confère une grande précision à la géométrie des pièces mises en forme grâce à l'utilisation de la lampe UV et du masque dynamique, où la contribution de l'équipement à la limitation de la résolution latérale se cantonne uniquement à la taille des micromiroirs et à la qualité du système optique. La résolution latérale théorique permise est de 14 μm , correspondant à la taille d'un micromiroir. Cependant, en pratique, la résolution latérale est également limitée par la diffusion du faisceau lumineux par les particules céramiques présentes au sein de la suspension photopolymérisable. Ceci se traduit par

l'apparition du phénomène de surpolymérisation qui sera spécifiquement caractérisé dans le paragraphe II.5.1.2.

II.4 Elaboration des suspensions photopolymérisables de SiHA

II.4.1 Exigences

Comme indiqué au paragraphe I.5.4.2, les suspensions utilisées dans le procédé de microstéréolithographie doivent être stables, homogènes et photosensibles à la longueur d'onde du faisceau utilisé (ici 365 nm). De plus, l'étape d'étalement de la suspension sur le support requiert un comportement rhéofluidifiant de la suspension, avec une contrainte seuil d'écoulement assurant l'absence d'écoulement lors de la projection du faisceau UV. Afin de permettre un bon étalement en fines couches homogènes sur le support, la viscosité doit être inférieure à 5 Pa.s pour un taux de cisaillement de 150 s^{-1} correspondant à la contrainte appliquée par le racleur lors de l'étalement de la suspension sur le banc. Une fois polymérisées, les suspensions doivent conduire à des objets solides non déformables possédant une bonne tenue mécanique et une architecture stable lors des traitements thermiques. Afin d'assurer la cohésion, la tenue mécanique et la densification des échantillons lors du frittage, les suspensions doivent être fortement chargées en particules céramiques. Selon la littérature, un taux de charge minimum de 50 %vol est requis pour assurer le maintien de l'architecture des pièces 3D lors du déliantage et la cohésion des grains lors du début de frittage.

II.4.2 Choix des constituants

Le constituant principal des suspensions photopolymérisables utilisées dans le procédé de microstéréolithographie est la poudre céramique. La seconde partie de la formulation est constituée du milieu organique. Ce dernier est lui-même composé d'une résine monomère photosensible définissant la structure du polymère, d'un diluant monomère apportant les propriétés rhéologiques adéquates, d'un photoinitiateur permettant de démarrer la réaction de polymérisation au contact du faisceau UV et d'un dispersant nécessaire à la stabilité des particules de poudre céramique en suspension. Pour des raisons de confidentialité, la nature

exacte (appellation et fournisseur) des constituants organiques (résine, diluant, photoinitiateur et dispersant) et des formulations ne sera pas explicitée.

II.4.2.1 Poudre céramique

La poudre utilisée dans la présente étude est une poudre SiHA synthétisée au sein du laboratoire selon le protocole décrit précédemment dans le paragraphe II.2 de ce chapitre. L'indice de réfraction de la poudre SiHA est considéré égal à celui d'HA qui vaut 1,63.

II.4.2.2 Résine

La résine doit être très réactive et posséder une viscosité la plus faible possible de façon à pouvoir charger au maximum les suspensions en poudre céramique. De plus, pour éviter les déformations des échantillons polymérisés lors de leur manipulation, le polymère obtenu doit présenter certaines propriétés mécaniques. En effet, les pièces polymérisées ne doivent pas être détériorées lors de leur décollement du support et pendant leur nettoyage. Elles doivent donc présenter d'une part une rigidité élevée et d'autre part une dureté élevée, c'est-à-dire une bonne résistance aux rayures, déchirures, éraflures et à la pénétration. En vue d'une tenue mécanique convenable des objets polymérisés et d'une bonne définition des géométries réalisées, la résine doit comporter une fonctionnalité élevée, c'est-à-dire un nombre important de fonctions actives par molécule, ou encore de liaisons pouvant s'établir avec d'autres molécules. Enfin, les indices de réfraction de la résine et de la poudre doivent être proches [224] afin de limiter le phénomène de diffusion [225].

Le Tableau 12 regroupe les résines utilisées dans différentes formulations de suspensions non aqueuses photopolymérisables, décrites dans la littérature. Les résines les plus utilisées pour les suspensions photopolymérisables non-aqueuses chargées de particules céramiques sont des acrylates. En particulier, le 1,6-hexanediol diacrylate (HDDA) et le polyethylene glycol diacrylate (PEG) sont très souvent cités. Cependant, les diacrylates ne possèdent que deux fonctions actives et conduisent, une fois polymérisés, à des couches flexibles peu rigides. En raison de sa faible viscosité, le PEG peut être utilisé comme diluant réactif lorsqu'il est combiné avec des monomères denses, et non comme résine principale à cause de sa faible fonctionnalité. Enfin, certains polyethers acrylates à amine modifiés (PEAAM) présentent une très bonne réactivité, une fonctionnalité élevée et conduisent à des

couches polymérisées peu flexibles possédant une résistance élevée aux déformations de type déchirures.

Référence	Charge	Résine
Griffith <i>et al.</i> [226]	Al ₂ O ₃ , SiO ₂ , Si ₃ N ₄	Acrylate (HDDA)
Hinczewski <i>et al.</i> [227]	Al ₂ O ₃	Acrylate
Zhang <i>et al.</i> [210]	Al ₂ O ₃	Acrylate (HDDA)
Jang <i>et al.</i> [228]	BaTiO ₃	Acrylate (HDDA)
Jiang <i>et al.</i> [229]	Pb(Zr, Ti)O ₃	Acrylate (HDDA)
Greco <i>et al.</i> [230]	Al ₂ O ₃	Acrylate
Chartier <i>et al.</i> [224]	Al ₂ O ₃ , SiO ₂ et ZrO ₂	Acrylate
Dufaud <i>et al.</i> [231]	Pb(Zr, Ti)O ₃	Acrylate (HDDA), époxy, et époxy-acrylate
Bertsch <i>et al.</i> [207]	Al ₂ O ₃	Acrylate (PEG 400 diacrylate)
Chartier <i>et al.</i> [215]	Al ₂ O ₃ et ZrO ₂ (+Y ₂ O ₃)	Acrylate (diacrylate)
Chartier <i>et al.</i> [232]	Al ₂ O ₃	Acrylate (diacrylate)
Wozniak <i>et al.</i> [233]	SiO ₂ amorphe	Acrylates
Tomeckova <i>et al.</i> [234]	SiO ₂	Acrylate (HDDA et ethoxylated pentaerythritol tetraacrylate)
Tomeckova <i>et al.</i> [235,236]	SiO ₂ et Al ₂ O ₃	Acrylate (HDDA et ethoxylated pentaerythritol tetraacrylate)
Badev <i>et al.</i> [237]	SiO ₂ , Al ₂ O ₃ , ZrO ₂ (+Y ₂ O ₃) et SiC	Acrylate (PEAAM + HDDA)
Chartier <i>et al.</i> [238]	SiO ₂	Acrylate (PEAAM + HDDA)
Licciulli <i>et al.</i> [239]	Al ₂ O ₃	Neopentyl(diallyl)oxy, triacryl zirconate
Lee <i>et al.</i> [211]	Al ₂ O ₃ et SiO ₂	Acrylique
Yang <i>et al.</i> [216]	Aucune	Acrylique
Yang <i>et al.</i> [216]	Aucune	Acrylique
Lee <i>et al.</i> [214]	Aucune	PPF + DEF
Lee <i>et al.</i> [240]	Aucune	PPF + DEF
Choi <i>et al.</i> [203]	Aucune	PPF + DEF
Lee <i>et al.</i> [204]	HA	PPF + DEF

Tableau 12 : Résines citées dans la littérature, pour la formulation de suspensions non aqueuses photopolymérisables (HDDA : 1,6-hexanediol diacrylate ; PEG : polyéthylène glycol ; PEAAM : polyether acrylate à amine modifiée ; PPF : polypropylène fumarate ; DEF : diéthyl fumarate)

Plusieurs résines ont été envisagées pour la formulation des suspensions. La résine retenue, notée R, est un PEAAM qui présente le meilleur compromis en termes de viscosité, de flexibilité (selon le test du mandrin cylindrique de la norme ISO1519⁶) et de dureté Persoz (évaluée selon la norme ISO1522⁷) des couches polymérisées. De plus, elle possède une fonctionnalité élevée ainsi qu'un indice de réfraction de proche de celui de la poudre. Cette résine R sera utilisée pour la totalité des formulations présentées dans cette étude.

⁶ ISO 1519:2011 : Peintures et vernis – Essai de pliage sur mandrin cylindrique.

⁷ ISO 1522:2006 : Peintures et vernis – Essai d'amortissement du pendule.

II.4.2.3 Diluant

Une suspension chargée à plus de 35 %vol de poudre céramique n'est pas réalisable avec la résine seule. L'ajout d'un agent diluant est nécessaire à l'obtention de suspensions chargées à plus de 50 %vol. Son choix est primordial dans le mesure où il doit permettre de faire diminuer la viscosité de la suspension jusqu'à des valeurs adaptées au procédé en préservant un taux de charge élevé en poudre céramique. Le diluant doit, en outre, être parfaitement miscible avec la résine et, si possible, être réactif afin de limiter la perte de réactivité.

Plusieurs diluants réactifs et miscibles avec la résine choisie ont été testés. Pour chacun d'eux, les courbes d'écoulement (Figure 26) sont enregistrées dans les conditions décrites en annexe V, pour un mélange de résine et de diluant dans des proportions fixées. Le choix s'est orienté sur le diluant n°5 en raison de la faible viscosité du système résine-diluant ($\eta < 20 \text{ mPa.s}$ à 150 s^{-1} , à 25°C) (Figure 26, Tableau 13).

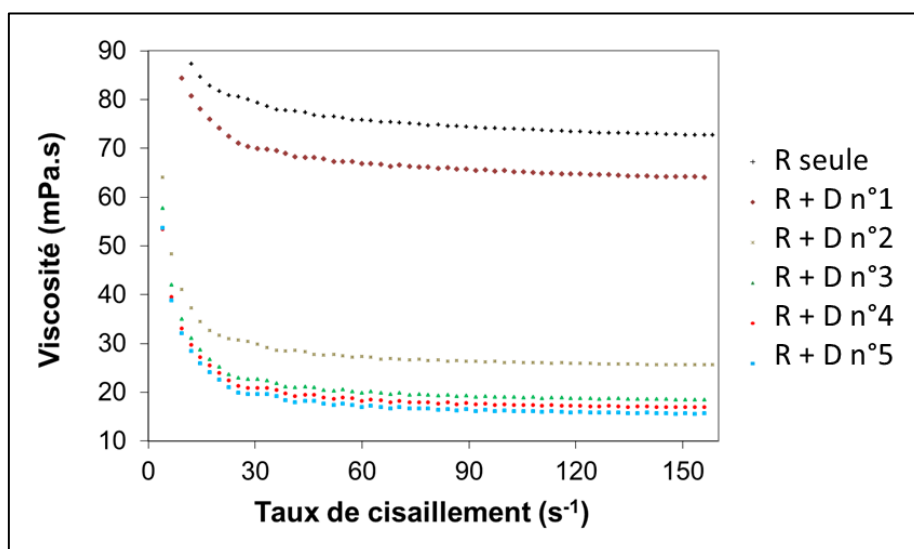


Figure 26 : Courbes d'écoulement de la résine R et des mélanges résine R – diluant D, à 25°C

Composition	Viscosité à 150 s^{-1} (à 25°C)
R seule	73
R + D n°1	64
R + D n°2	26
R + D n°3	18
R + D n°4	17
R + D n°5	16

Tableau 13 : Viscosité à 150 s^{-1} (à 25°C) de la résine R et des mélanges résine R – diluant D

Son efficacité a été vérifiée en réalisant des mesures rhéologiques sur quatre suspensions, chargées en poudre céramique, contenant des taux différents de diluant. Pour faciliter la mise en suspension et les mesures rhéologiques, les suspensions sont chargées à 36 %vol. Les taux de dispersant et de photoinitiateur sont fixés respectivement à $1,10 \text{ mg/m}^2$ par rapport à la poudre et 0,5 %m par rapport à la masse de solvant (R + D). Dans la Figure 27, sont reportées les valeurs des viscosités à 150 s^{-1} des suspensions, moyennées à partir des valeurs relevées sur deux courbes d'écoulement effectuées à taux de cisaillement croissant et décroissant. L'ajout du diluant rend possible la mise en suspension d'un mélange chargé en poudre céramique à 36 %vol non réalisable avec la résine seule, à partir d'un taux de diluant de 20 %vol par rapport au solvant (R + D). Enfin, l'efficacité de ce diluant est mise en évidence par la décroissance de la viscosité de la suspension avec l'augmentation du taux de diluant, suivant une loi de puissance précisée dans la Figure 27.

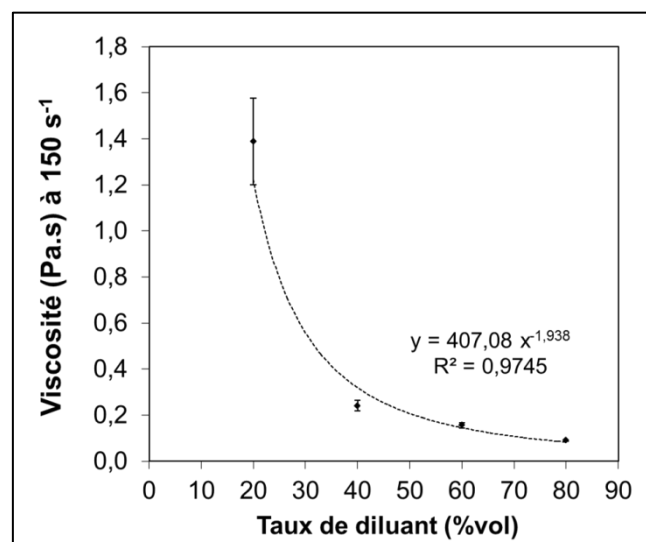


Figure 27 : Evolution de la viscosité des suspensions avec le taux de diluant (exprimé par rapport au volume total de solvant : R + D), pour un taux de charge fixé à 36 %vol

II.4.2.4 Dispersant

La présence de dispersant est nécessaire pour compenser les forces d'attraction de Van der Waals entre les particules solides agglomérées et permettre la dispersion de ces particules.

Le dispersant est choisi en fonction des propriétés des particules céramiques à disperser et du milieu liquide au sein duquel elles sont mises en suspension. Les dispersants couramment utilisés dans les suspensions aqueuses de phosphates de calcium sont de type polyacrylate d'ammonium [149,174,241–245] ou de sodium [246]. Mais ces derniers ne sont pas efficaces au sein des résines acrylates. Les dispersants généralement utilisés dans les milieux photosensibles non aqueux sont de type électrostérique (Tableau 14). Le dispersant agit par combinaison de répulsions électrostatiques, en développant une charge à la surface des particules à laquelle il s'adsorbe, et de répulsions stériques par extension des chaînes moléculaires au sein du solvant. Le dispersant choisi sur la base de cette étude bibliographique est un ester phosphorique (EP).

Référence	Solvant	Charge	Dispersant(s)
Jang <i>et al.</i> [228]	Acrylate	BaTiO ₃	Acide stéarique
Tomeckova <i>et al.</i> [234–236]	Acrylate	SiO ₂ et Al ₂ O ₃	Phosphate d'ammonium alkoxylé
Hinczewski <i>et al.</i> [227]	Acrylate	Al ₂ O ₃	Electrostérique
Dufaud <i>et al.</i> [231]	Acrylate	PZT	Electrostérique (EP)
Chartier <i>et al.</i> [224]	Acrylate	Al ₂ O ₃ , SiO ₂ et ZrO ₂	Electrostérique
Lee <i>et al.</i> [211]	Acrylique	Al ₂ O ₃ , SiO ₂	Electrostérique (EP)
Chartier <i>et al.</i> [215]	Acrylate	Al ₂ O ₃ et ZrO ₂ (+Y ₂ O ₃)	Electrostérique
Badev <i>et al.</i> [237]	Acrylate	SiO ₂ , Al ₂ O ₃ , ZrO ₂ (+Y ₂ O ₃) et SiC	Electrostérique (EP)
Chartier <i>et al.</i> [238]	Acrylate	SiO ₂	Electrostérique (EP)

Tableau 14 : Dispersants utilisés dans les suspensions photosensibles non aqueuses (EP : ester phosphorique)

II.4.2.5 Photoinitiateur

Le photoinitiateur doit être miscible avec les autres constituants du milieu organique et être sensible à la longueur d'onde du faisceau UV (365 nm). Les principaux photoinitiateurs mentionnés dans la littérature sont présentés dans le Tableau 16. Le photoinitiateur utilisé ici est le 2,2-dimethoxy-1,2-diphenyl-éthanone (EDMD).

II.4.3 Protocole de préparation des suspensions

La préparation des suspensions se déroule en quatre étapes (Figure 28) : le traitement de la poudre (calcination et broyage par attrition), la préparation du milieu organique, l'introduction de la poudre dans le milieu organique et l'homogénéisation de la suspension par passages au tricylindre (Exakt 50 Classic).

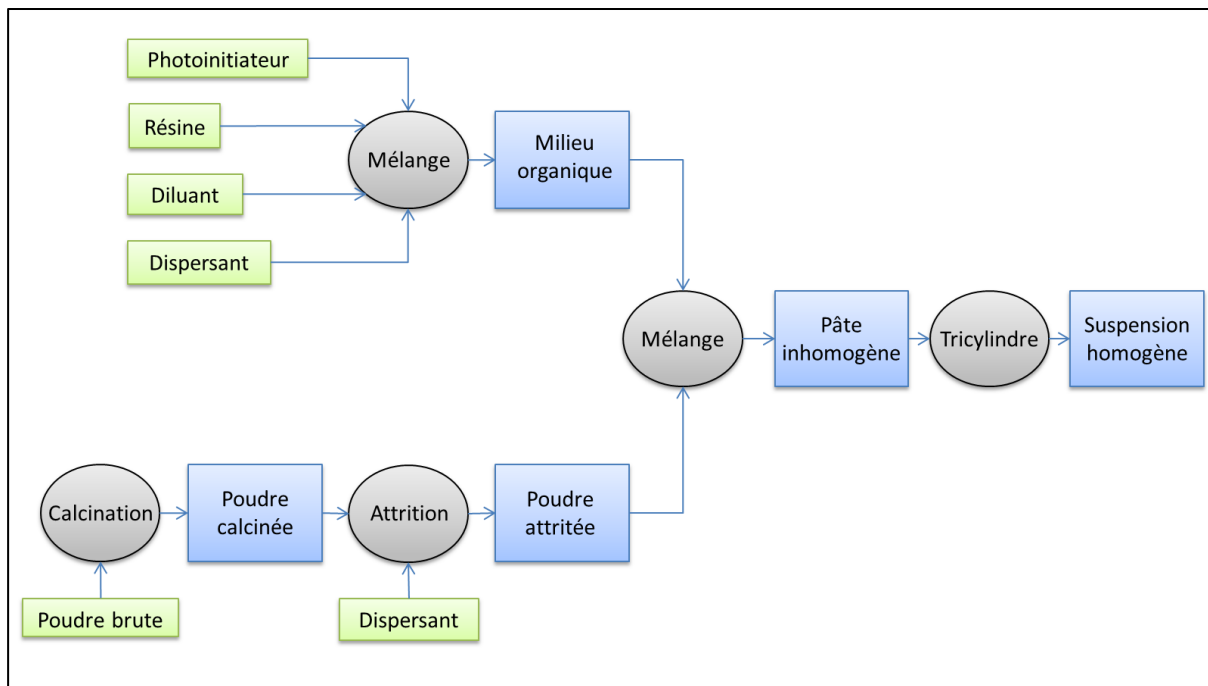


Figure 28 : Diagramme de préparation des suspensions

II.4.3.1 Préparation des poudres

Les suspensions utilisées pour l'étude des formulations sont réalisées avec un lot de poudre regroupant douze synthèses effectuées selon le protocole décrit au paragraphe II.1. Les valeurs de surface spécifique et de masse volumique données dans ce paragraphe correspondent aux moyennes des valeurs mesurées sur les 12 poudres étudiées, selon les protocoles expérimentaux décrits en annexes III et IV.1.

En vue d'une mise en suspension dans les résines organiques, les poudres utilisées doivent être chimiquement stables et présenter une distribution granulométrique monomodale et resserrée. Une telle distribution granulométrique permet de limiter le phénomène de

diffusion lors de l'irradiation et d'assurer une bonne définition et reproductibilité des pièces mises en forme. Une taille de grain trop petite peut également favoriser le phénomène de diffusion. Les poudres brutes (Figure 29-a), de surface spécifique $66 \pm 3 \text{ m}^2/\text{g}$, sont inadaptées à la mise en suspension.

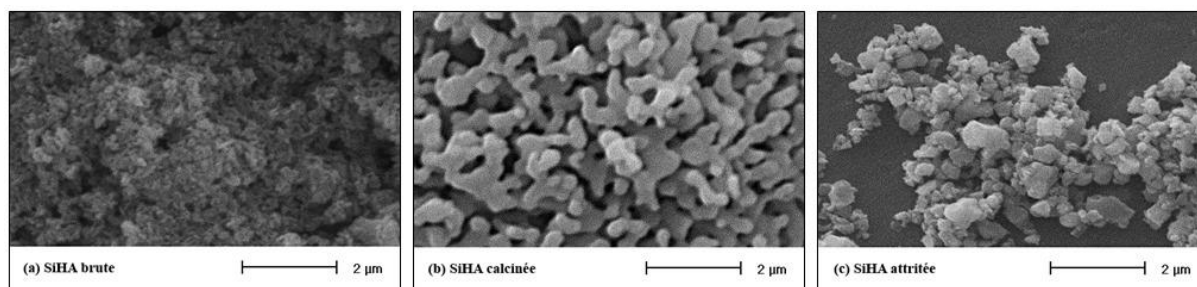


Figure 29 : Micrographies MEB de poudres de SiHA : brute (a), calcinée à 1200°C - 30min (b) et attritée à 800 tr/min – 8h (c)

Comme il a été précisé au paragraphe II.2, un traitement thermique des poudres brutes de SiHA, à une température supérieure à 1000°C , est nécessaire pour assurer l'incorporation totale du silicium au sein de la structure apatitique [48,77,82]. La température de calcination des lits de poudre est fixée à 1200°C pendant 30 min, sous air, dans un four à moufle (Nabertherm LH30/13), avec des rampes de montée et descente en température de $10^\circ\text{C}.\text{min}^{-1}$, afin de s'assurer de la stabilité chimique des poudres. Ce traitement thermique conduit à l'obtention d'une répartition granulométrique grossière en raison du phénomène de croissance granulaire (Figure 30) et à une réduction considérable de la surface spécifique ($2,4 \pm 0,4 \text{ m}^2/\text{g}$). Afin de détruire les agrégats formés pendant l'étape de calcination (Figure 29-b) et d'obtenir une répartition granulométrique adaptée, les poudres calcinées sont broyées par attrition à l'aide d'un broyeur Netzsch à 800 tr/min pendant 8 h. Le broyage est effectué dans une jarre en téflon contenant de l'éthanol dénaturé à 96 %, des billes en zircone de 1 mm de diamètre, et le dispersant EP à hauteur de 1 % massique par rapport à la poudre. Le taux de remplissage de la jarre est limité à 2/3 du volume total afin de minimiser les pertes par projection durant le broyage et la fraction volumique de chaque constituant (poudre, billes, éthanol) est fixée à 1/3, le volume de dispersant étant négligeable. La distribution granulométrique initiale de la poudre calcinée est large et bimodale (Figure 30). Elle évolue, durant l'attrition, vers une distribution plus resserrée quasi monomodale. Le suivi de la distribution granulométrique (méthode de mesure précisée en Annexe VII) permet de

confirmer la nécessité d'une durée de 8h de broyage pour l'obtention d'une distribution quasi monomodale. Le broyage n'est pas prolongé au-delà de cette durée afin de ne pas atteindre une taille de grain trop petite pouvant nuire au procédé de mise en forme en raison du phénomène de diffusion. La suspension obtenue après attrition est passée au tamis à 600 μm , afin de la séparer des billes de broyage, et séchée à l'étuve à 100°C pendant 24 h. La poudre sèche agglomérée est ensuite passée au tamis à 400 μm pour isoler les éventuels agglomérats. La poudre attritée (Figure 29-c), possède une surface spécifique de $11 \pm 1 \text{ m}^2/\text{g}$.

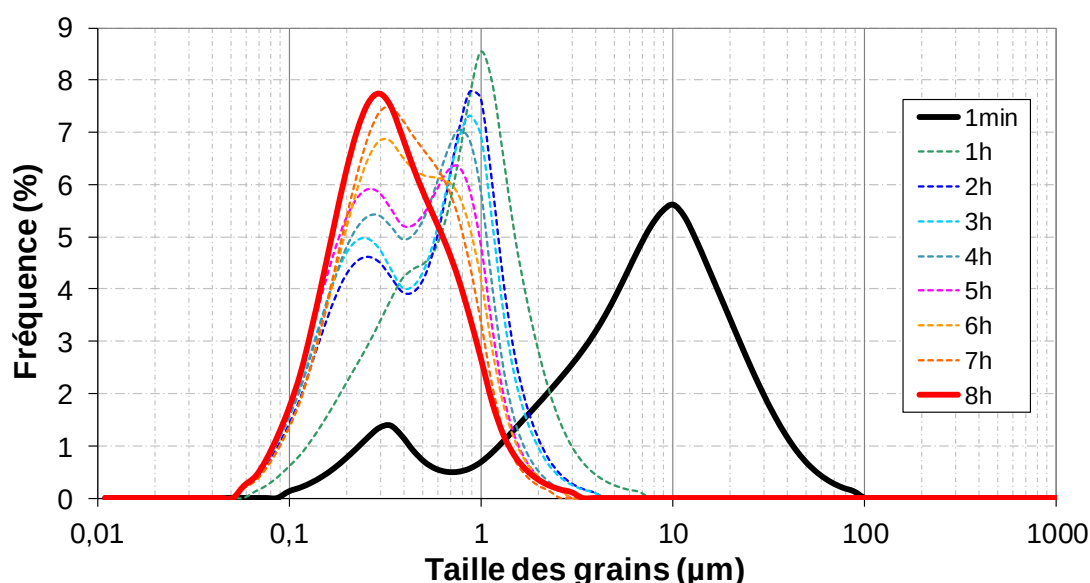


Figure 30 : Evolution de la distribution granulométrique des poudres SiHA durant l'attrition (fréquence en volume)

La présence du dispersant à la surface des poudres, après attrition, est contrôlée par spectrométrie infrarouge (Annexe II.2), après séchage sous vide d'un échantillon de poudre, afin de s'affranchir des éventuelles pollutions adsorbées en surface de la poudre. Les spectres IRTF des poudres attritées (Figure 31-c) présentent des bandes d'adsorption symétrique et asymétrique, respectivement à 2855 cm^{-1} et 2923 cm^{-1} , relatives aux liaisons CH_2 des segments aliphatiques présents dans le dispersant. Ces deux bandes de vibration sont caractéristiques du dispersant (Figure 31-a) et n'apparaissent pas sur les spectres des poudres calcinées à 1200°C, avant son addition (Figure 31-b).

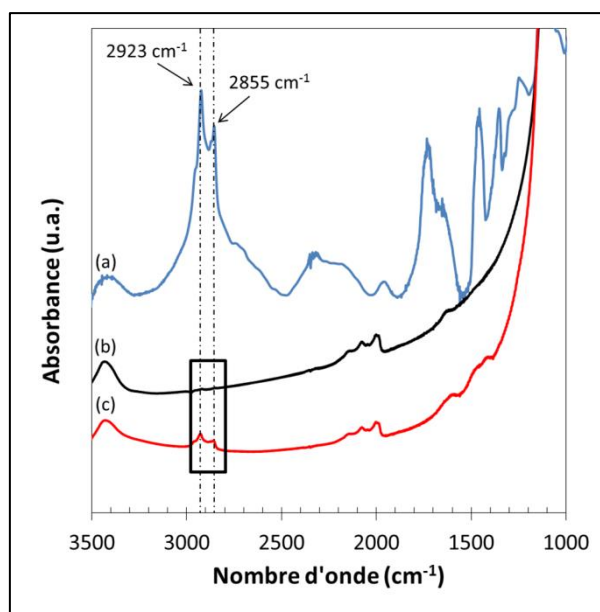


Figure 31 : Spectres IRTF du dispersant (a) et des poudres SiHA calcinées à 1200°C, non attritées (b) et attritées en présence du dispersant (c)

La quantité de dispersant adsorbée est vérifiée par analyse thermogravimétrique (Annexe VI). Lors d'une montée en température de 20°C à 1000°C, à 5°C/min, une différence de perte de masse d'environ 1 %, à la précision expérimentale près, est enregistrée entre la poudre attritée et la poudre non attritée (Figure 32). Ce pourcentage massique correspond au taux de dispersant introduit lors de l'étape d'attrition. Ce résultat confirme l'adsorption quantitative du dispersant à la surface de la poudre. L'élimination du dispersant se produit entre 200°C et 400°C (Figure 32) et l'analyse calorimétrique différentielle DSC permet de préciser sa température de vitesse maximale de volatilisation autour de 275°C (Figure 33).

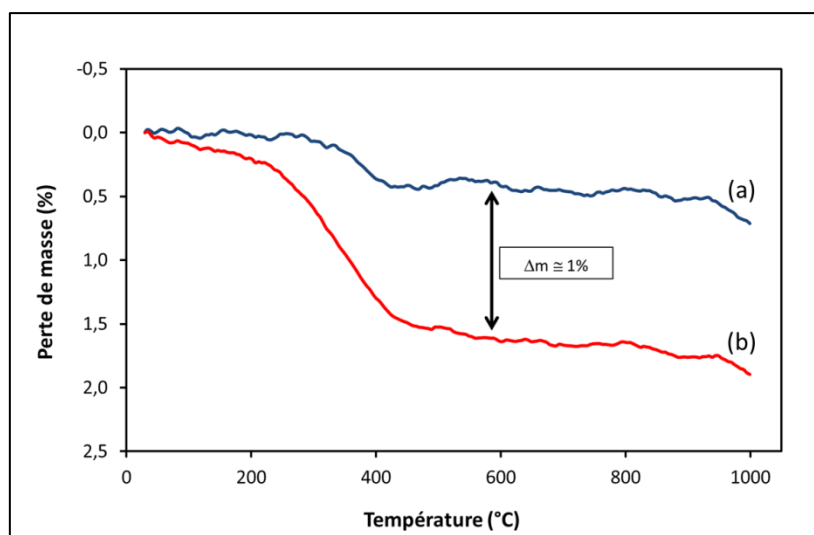


Figure 32 : Courbes d'analyse thermogravimétrique des poudres SiHA non attritées (a) et attritées en présence de dispersant (b)

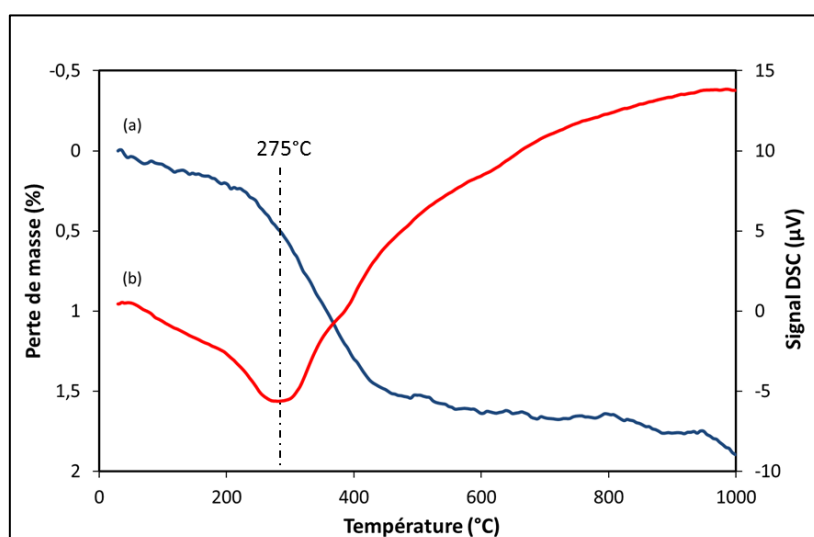


Figure 33 : Courbes d'analyse thermogravimétrique (a) et calorimétrique différentielle (b) des poudres SiHA attritées en présence de dispersant

Après chaque étape de traitement, la poudre est homogénéisée et caractérisée par DRX, IRTF, BET et pycnométrie à hélium, selon les protocoles décrits en annexes II, III, et IV.1. Les caractéristiques d'un lot de poudre regroupant douze synthèses, mesurées expérimentalement, sont précisées dans le Tableau 15. Aucune phase secondaire n'est détectée, ni par DRX ni par IRTF, après calcination à 1200°C. La masse volumique de la poudre calcinée ($3,14 \pm 0,03 \text{ g/cm}^3$), obtenue par pycnométrie à hélium, est légèrement supérieure à la masse volumique théorique ($3,119 \text{ g/cm}^3$) calculée à partir des affinements de

paramètres de maille d'une poudre de même composition chimique traitée thermiquement à 1000°C pendant 15 h [82]. Cependant l'écart entre les valeurs est inférieur à l'incertitude de mesure du pycnomètre à hélium ($0,05 \text{ g/cm}^3$). Par contre, la masse volumique de la poudre mesurée après attrition n'est que de $3,05 \pm 0,02 \text{ g/cm}^3$. Cette valeur, significativement plus faible, peut être due à la présence de dispersant à la surface de la poudre, cette dernière n'étant séchée qu'à 100°C après attrition, température inférieure à la température de départ du dispersant (Figure 33). La valeur théorique de masse volumique de $3,119 \text{ g/cm}^3$, est choisie pour les calculs de formulation. En revanche, les poudres subissent un dégazage sous vide à 250°C pendant une nuit avant les mesures BET, garantissant ainsi la disparition totale du dispersant adsorbé à la surface des poudres. La valeur de surface spécifique obtenue expérimentalement par BET après attrition ($10,90 \pm 1,15 \text{ m}^2/\text{g}$) correspond donc à celle de la poudre SiHA seule et peut être prise en compte pour les calculs de formulation.

Caractérisation	Avant calcination	Après calcination à 1200°C	Après attrition
BET : surface spécifique	$66 \pm 3 \text{ m}^2/\text{g}$	$2,4 \pm 0,4 \text{ m}^2/\text{g}$	$10,9 \pm 1,2 \text{ m}^2/\text{g}$
Pycnométrie : masse volumique	$2,9 \pm 0,1 \text{ g/cm}^3$	$3,1 \pm 0,1 \text{ g/cm}^3$	$3,1 \pm 0,1 \text{ g/cm}^3$

Tableau 15 : Caractéristiques d'un lot de poudre SiHA, avant puis après traitements thermique et mécanique

II.4.3.2 Mise en suspension

Le milieu organique est préparé par pesées, à l'aide d'une balance de précision à 10^{-4} g , avant la mise en suspension de la poudre. Les constituants organiques sont ajoutés dans l'ordre suivant : résine, diluant, photoinitiateur et dispersant. Le mélange est ensuite placé sur agitateurs à rouleaux pendant une heure.

La poudre de SiHA attritée et séchée est introduite dans le milieu organique progressivement, gramme par gramme. A chaque ajout, tant que la suspension conserve un aspect fluide, le mélange est homogénéisé uniquement par agitation manuelle. Lorsque la suspension commence à acquérir un aspect visqueux voire pâteux, l'homogénéisation se fait par agitation au turbulatur. Après incorporation, au sein du milieu organique, du taux de poudre requis, la suspension obtenue est placée sur agitateurs à rouleaux.

Après stabilisation d'au moins dix heures sur agitateurs à rouleaux, la suspension est passée au tricylindre (Exakt 50 Classic) afin de détruire les éventuels agglomérats créés durant le séchage de la poudre ou lors de sa mise en suspension. Cette désagglomération provoque la libération progressive de la partie du solvant initialement piégée dans les agglomérats de poudre, le rendant ainsi actif dans le comportement rhéologique de la suspension. Le passage au tricylindre est nécessaire afin d'obtenir une suspension homogène et stable qui permette une action optimale du dispersant. L'efficacité du passage au tricylindre est mise en évidence par comparaison des valeurs de viscosité des suspensions avant et après passage(s). L'homogénéisation des suspensions se traduit par un meilleur écoulement de ces dernières. A titre d'exemple, la Figure 34 présente les viscosités de deux suspensions de rapport résine/diluant identique, chargées respectivement à 50 %vol et 55 %vol en poudre céramique, avant et après passage(s). L'utilisation du tricylindre permet de diminuer significativement la viscosité des suspensions. Ce phénomène est d'autant plus marqué que le taux de charge en céramique est élevé. L'influence de cette étape sur la rhéologie et la réactivité des suspensions sera précisée au paragraphe II.4.4.3.

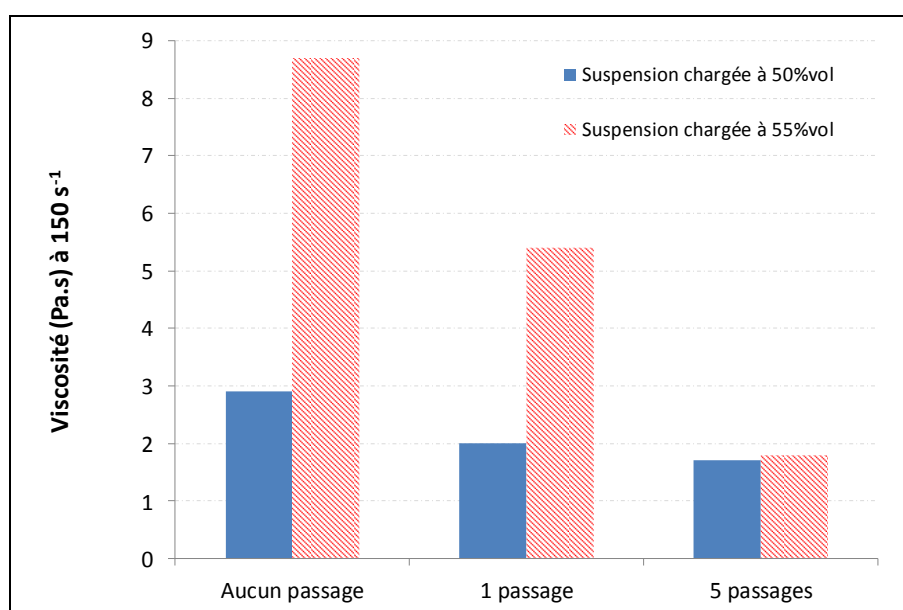


Figure 34 : Evolution de la viscosité des suspensions avec les passages au tricylindre

II.4.4 Etude des formulations

II.4.4.1 Taux de photoinitiateur

Une quantité trop faible de photoinitiateur (PI) au sein de la suspension se traduit par une absence de photopolymérisation de la suspension au contact du faisceau UV. En revanche, un excès de PI peut provoquer un taux de réticulation élevé en surface, agissant comme un filtre et empêchant ainsi la pénétration du faisceau UV en profondeur. Le taux de PI est donc choisi le plus faible possible de façon à déclencher la réaction de polymérisation sans engendrer d'effet filtre.

La détermination du taux de PI se base, dans un premier temps, sur une étude bibliographique permettant de déterminer l'ordre de grandeur généralement utilisé pour ce type de suspensions. Le Tableau 16 regroupe les taux de PI de certaines suspensions photopolymérisables décrites dans la littérature.

Référence	PI	Taux de PI (%m / solvant)
Chartier <i>et al.</i> [224]	EDMD	0,3 ; 0,4 ; 0,5 ; 0,6 ; 0,7 ; 0,8 ; 0,9 ; 1,0
Chartier <i>et al.</i> ; Abouliatim <i>et al.</i> [215,232,247]	EDMD	0,5
Lee <i>et al.</i> [240]	BAPO	0,1 ; 0,5 ; et 1
Lee <i>et al.</i> [204]	BAPO	1
Choi <i>et al.</i> [203]	BAPO	2
Hinczewski <i>et al.</i> ; Badev <i>et al.</i> [227,237]	DMPA	0,5
Dufaud <i>et al.</i> [231]	DMPA	1
Lee <i>et al.</i> [214]	DMPA	4
Bertsch <i>et al.</i> [207]	DMPA	5
Jang <i>et al.</i> ; Greco <i>et al.</i> ; Licciulli <i>et al.</i> [228,230,239]	1-hydroxycyclohexyl phenyl ketone	3
Zhang <i>et al.</i> [210]	benzoin ethyle ether	4
Zhang <i>et al.</i> [210]	1-[4-(2-Hydroxyethoxy)-phenyl]-2hydroxy-2-methyl-1-propane-1-one	4
Wozniak <i>et al.</i> [233]	Thioxanthone 2,4,6-Trimethylbenzoyldiphenylphosphine oxide	5

Tableau 16 : Taux de photoinitiateur mentionnés dans la littérature (EDMD : Ethanone, 2,2-Diméthoxy-1,2-diphényl- ; BAPO : oxyde bis-acylphosphine ; DMPA : diméthoxy phényl acétophénone)

Les taux de PI généralement utilisés se situent entre 0,1 %m et 5,0 %m par rapport à la masse de solvant (résine + diluant) présente dans la suspension. Une étude menée par Dufaud *et al.* [248] sur des suspensions de PZT dans des résines epoxy-acrylates chargées à 40 %m, montre que des taux de PI inférieurs à 0,3 %m conduisent à une polymérisation insuffisante en raison de la consommation des radicaux par l'oxygène. Selon une étude menée par Chartier *et al.* [224] sur des suspensions d'alumine, de zircone et de silice, chargées à 50 %vol et 60 %vol dans des monomères acrylates, une variation du taux de PI, pour des valeurs inférieures à 1,0 %m, n'influence pas significativement la réactivité des suspensions. En revanche, un taux de PI supérieur à 2,0 %m conduit à une perte de réactivité en raison d'une absorption du faisceau par la surface rapidement polymérisée. Enfin, une étude plus récente menée par Badev *et al.* [237], sur des suspensions d'alumine dans du PEAAM avec des taux de PI de 0,25 %m, 0,5 %m, 0,7 %m et 1,0 %m, a montré par spectroscopie infrarouge en temps réel que le taux de conversion maximum de la double liaison acrylate est obtenu avec un taux de PI de 0,5 %m.

Différents taux de PI sont testés expérimentalement, par irradiation UV de suspensions de SiHA chargées à 50 %vol, pendant 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 et 20 s. Les taux de PI testés sont de 0,3 ; 0,5 ; 1,0 %m par rapport à la masse de solvant (résine + diluant). Les taux à 0,5 et 1,0 %m permettent la photopolymérisation des suspensions. En revanche, le taux à 0,3 % se révèle insuffisant pour déclencher la réaction de polymérisation, quel que soit le temps d'exposition. Le taux de PI est donc fixé à 0,5 %m par rapport à la masse de solvant (résine + diluant), par recoupement de l'étude bibliographique et de l'étude expérimentale.

II.4.4.2 Taux de dispersant

Le dispersant ayant une influence sur la stabilité des suspensions, la détermination du taux de dispersant est effectuée par étude rhéologique. L'activité du dispersant n'étant pas liée au taux de charge en poudre mais à sa quantité par unité de surface, cette étude est réalisée avec une charge peu élevée en poudre céramique (40 % volumique) afin de faciliter la mise en suspension.

La suspension initiale est réalisée sans dispersant ajouté au milieu organique. La quantité initiale de dispersant se limite donc à celle adsorbée à la surface de la poudre lors de l'étape d'attrition, à hauteur de 1 % massique par rapport à la poudre. Une mesure de viscosité

est réalisée sur cette première suspension suivant le protocole décrit en annexe V. Une faible quantité de dispersant est ensuite incorporée à la suspension initiale. La suspension obtenue est homogénéisée pendant 10 minutes au turbulatur puis stabilisée pendant 10 minutes sur agitateur rotatif. Une seconde mesure de viscosité est effectuée sur cette suspension. Les étapes d'ajout de dispersant, d'homogénéisation, de stabilisation et de mesure de viscosité sont renouvelées plusieurs fois afin d'établir l'évolution de la viscosité en fonction du taux massique de dispersant. Le taux de dispersant est ramené à la surface spécifique de la poudre ($10,90 \pm 1,15 \text{ m}^2/\text{g}$, Tableau 15). L'évolution de la viscosité en fonction du taux de dispersant est présentée en Figure 35. L'augmentation du taux de dispersant, entre 0,9 et $1,1 \text{ mg/m}^2$, permet de diminuer la viscosité de la suspension, grâce à l'adsorption des chaînes moléculaires à la surface des particules. Ces chaînes moléculaires agissent alors par répulsion électrostatique en créant une charge de surface et par répulsion stérique en s'étendant dans le solvant peu polaire. Au-dessus de $1,10 \text{ mg/m}^2$, l'augmentation du taux de dispersant provoque une élévation de la viscosité en raison de la réagglomération des particules. L'attraction entre les particules résulte d'un effet de compensation de charge, par formation d'une double couche adsorbée (double couche d'Helmholtz). De plus, le taux optimal de dispersant établi pour cette suspension est de $1,1 \text{ mg/m}^2$ par rapport à la surface de la poudre.

Dans le cas de suspensions fortement chargées en particules céramiques de petite taille, l'extension des chaînes de dispersant se fait difficilement, ce qui limite la répulsion stérique. Une augmentation du taux de charge engendre donc une augmentation de la viscosité mais n'affecte cependant pas la valeur optimale de taux de dispersant. Ce résultat peut donc être appliqué aux suspensions chargées à plus de 50 %vol. Cette valeur de $1,1 \text{ mg/m}^2$ de dispersant est fixée pour toutes les formulations présentées dans la suite de l'étude.

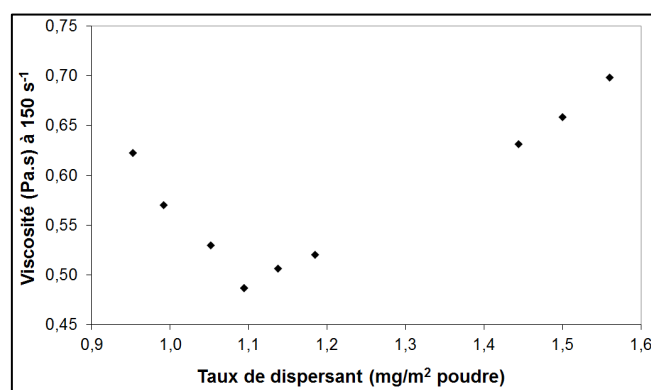


Figure 35 : Evolution de la viscosité à 150 s^{-1} et 25°C en fonction du taux de dispersant

II.4.4.3 Taux de charge et taux de diluant

La rhéologie des suspensions dépend principalement du taux de charge et du taux de diluant de ces dernières. En effet, l'ajout d'une charge céramique engendre une élévation importante de la viscosité du système mais l'addition d'un diluant permet d'abaisser la viscosité. La réactivité des suspensions est elle-aussi impactée par le taux de charge et le taux de diluant. L'ajout d'une charge céramique fait systématiquement chuter la réactivité des suspensions et l'addition d'un diluant, en diminuant le ratio de résine, est également susceptible d'abaisser leur réactivité, la réactivité des suspensions étant principalement apportée par la résine. Cette dernière, une fois polymérisée, permet également le maintien de l'architecture et la rigidité de la pièce en cru. L'impact du taux de diluant sur la réactivité de la suspension peut néanmoins être limité si le diluant est lui-même réactif.

Différentes formulations de suspensions sont envisagées pour étudier l'influence du taux de charge et du taux de diluant sur la rhéologie et la réactivité des suspensions. Pour toutes les formulations le taux de photoinitiateur est fixé à 0,5 %m par rapport à la masse totale de solvant (photoinitiateur, dispersant, résine et diluant) et le taux de dispersant à 1,10 mg/m² par rapport à la surface de la poudre. Il a été montré par Tomeckova *et al.* [234–236], sur des suspensions de silice et d'alumine dans des monomères acrylates, que l'énergie critique E_c est inversement proportionnelle à la concentration de photoinitiateur. Le fait de fixer le taux de photoinitiateur pour toutes les formulations, permet de s'affranchir de l'éventuelle influence de celui-ci sur l'énergie critique.

La nomenclature adoptée pour les formulations est la suivante : les lettres R et D représentent le numérateur et le dénominateur du ratio Résine/Diluant et la lettre P précède la valeur du taux de poudre (ou taux de charge) volumique. Selon l'étude bibliographique présentée au paragraphe I.5.4.2, les suspensions doivent comporter un taux de charge en céramique d'au moins 50 % volumique. Sur cette base, trois taux de charge sont envisagés pour l'étude des formulations : 50, 55, et 60 %. Deux proportions de diluant sont étudiées et correspondent aux ratios $(R/D)_{\max}$ et $(R/D)_{\min}$. Les six formulations ainsi envisagées sont répertoriées dans le Tableau 17.

Suspensions	Taux de PI (par rapport à la masse totale de solvant)	Taux de dispersant (par rapport à la surface de poudre)	Taux de charge (par rapport au volume total de suspension)
(R/D)_{min} - P50	0,5 %m	1,10 mg/m ²	50 %vol
(R/D)_{min} - P55	0,5 %m	1,10 mg/m ²	55 %vol
(R/D)_{min} - P60	0,5 %m	1,10 mg/m ²	60 %vol
(R/D)_{max} - P50	0,5 %m	1,10 mg/m ²	50 %vol
(R/D)_{max} - P55	0,5 %m	1,10 mg/m ²	55 %vol
(R/D)_{max} - P60	0,5 %m	1,10 mg/m ²	60 %vol

Tableau 17 : Formulations envisagées pour l'étude du taux de charge et du taux de diluant (Nomenclature : les lettres R et D représentent le numérateur et le dénominateur du ratio Résine/Diluant et la lettre P précède la valeur du taux de charge volumique)

Les suspensions utilisées pour l'étude des formulations sont réalisées avec un lot de poudre regroupant douze synthèses effectuées selon le protocole décrit au paragraphe II.1. Les caractéristiques du lot de poudre, précisées au paragraphe II.4.3.1 (Tableau 15).

a. Etude rhéologique

La suspension (R/D)_{max}-P60 (Tableau 17) ne peut pas être réalisée en raison de la prise en masse avant l'incorporation totale de la poudre. Les cinq autres suspensions sont réalisées et leur comportement rhéologique est étudié selon les conditions décrites en annexe V. Afin de préciser l'influence du nombre de passages au tricylindre sur les propriétés rhéologiques des suspensions, celles-ci sont étudiées sans et après un ou cinq passage(s). La suspension (R/D)_{min}-P60 présente un comportement de type rhéoépaississant pour des taux de cisaillement supérieurs à 30 s⁻¹ (Figure 36).

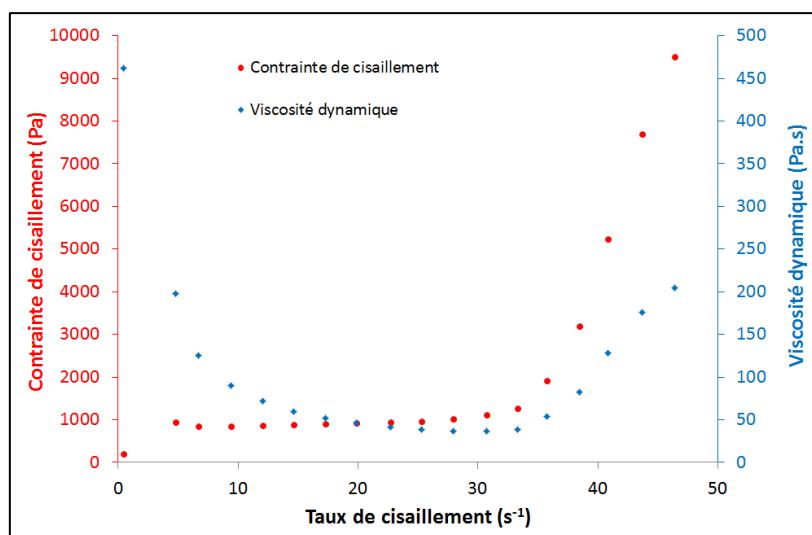


Figure 36 : Rhéogramme de la suspension $(R/D)_{min}-P60$

En revanche, les suspensions $(R/D)_{min}-P50$, $(R/D)_{min}-P55$, $(R/D)_{max}-P50$ et $(R/D)_{max}-P55$ correspondent à des fluides plastiques rhéofluidifiants (Figure 37). Les valeurs de viscosité à $150 s^{-1}$ pour ces différentes suspensions sont consignées dans le Tableau 18.

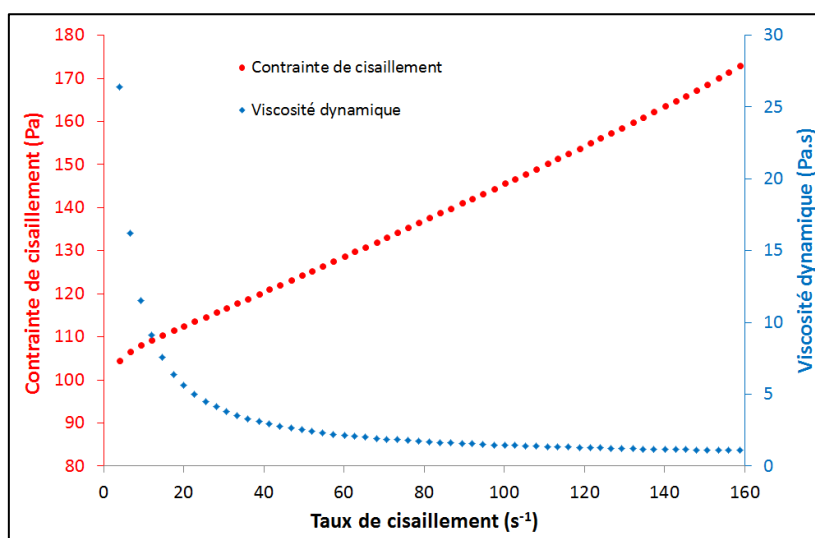


Figure 37 : Rhéogramme de la suspension $(R/D)_{min}-P50$ (les rhéogrammes des suspensions $(R/D)_{min}-P55$, $(R/D)_{max}-P50$ et $(R/D)_{max}-P55$ sont similaires avec des valeurs de contraintes seuil et de viscosité plus élevées)

Suspension	Viscosité (Pa.s) à 25°C et à 150 s ⁻¹ (avant passage au tricylindre) (± 0,1)	Viscosité (Pa.s) à 25°C et à 150 s ⁻¹ (1 passage au tricylindre) (± 0,1)	Viscosité (Pa.s) à 25°C et à 150 s ⁻¹ (5 passages au tricylindre) (± 0,1)
(R/D) _{min} - P50	1,2	1,0	1,2
(R/D) _{min} - P55	4,6	3,0	3,1
(R/D) _{max} - P50	2,9	2,0	1,7
(R/D) _{max} - P55	8,7	5,4	1,8

Tableau 18 : Viscosité des suspensions avant passage au tricylindre, puis après un puis cinq passages

Le comportement rhéologique de ces suspensions est régi par la loi d'Herschel-Bulkley (Équation 12), avec un ordre de puissance inférieur à 1. Les paramètres ajustés sur la zone d'intérêt (0-50 s⁻¹) à l'aide du logiciel Trios® (TA Instrument) sont donnés dans le Tableau 19, pour les suspensions ayant subi cinq passages au tricylindre.

$\tau = \tau_0 + k \times \gamma^n$

Équation 12 : Loi d'Herschel-Bulkley régissant le comportement rhéologique des suspensions (R/D)_{min}-P50, (R/D)_{min}-P55, (R/D)_{max}-P50 et (R/D)_{max}-P55 ; τ : contrainte de cisaillement (Pa), τ_0 : contrainte seuil (Pa) ; k : indice de consistance ; γ : taux de cisaillement (s⁻¹) ; n : ordre de la loi de puissance

Suspension	Contrainte seuil d'écoulement τ_0 (Pa)	Ordre n de la loi d'Herschel-Bulkley	Coefficient de corrélation R ²
(R/D) _{min} - P50	102	0,84	0,999
(R/D) _{min} - P55	168	0,74	0,996
(R/D) _{max} - P50	130	0,81	1,000
(R/D) _{max} - P55	140	0,75	1,000

Tableau 19 : Paramètres ajustés selon la loi d'Herschel-Bulkley, sur l'intervalle de taux de cisaillement 0-50 s⁻¹, pour les suspensions ayant subi cinq passages au tricylindre

Globalement, une augmentation du taux de charge et/ou du taux de diluant provoque une élévation de la viscosité (Tableau 18). Le passage au tricylindre permet cependant de réduire considérablement la viscosité des suspensions, quelle que soit leur formulation. Pour la formulation (R/D)_{max}-P55, contenant peu de diluant et fortement chargée en particules

céramiques, cinq passages sont nécessaires à l'obtention d'une viscosité inférieure à 5 Pa.s. En revanche, pour les trois autres formulations, un seul passage est suffisant. Après un ou cinq passage(s) au tricylindre selon les cas, les suspensions possèdent toutes une viscosité inférieure strictement à 5 Pa.s et une contrainte seuil d'écoulement située entre 100 et 200 Pa (Tableau 19). Les suspensions chargées à 50 %vol et 55 %vol, surlignées dans le Tableau 17, possèdent donc des propriétés d'écoulement adéquates au procédé de microstéréolithographie. Au final, seules ces quatre suspensions, sont sélectionnées pour les tests de réactivité et définition.

b. Test de réactivité

Lors de la projection du faisceau UV sur la surface d'une suspension photopolymérisable, l'épaisseur polymérisée Cd est liée à la profondeur de pénétration du faisceau Dp , à la densité d'énergie reçue Ei et à la densité d'énergie critique Ec , par l'équation de Jacobs (Équation 11), expliquée au paragraphe II.3.1.

$$Cd = Dp \cdot \ln\left(\frac{Ei}{Ec}\right)$$

Equation 11 : Equation de Jacobs

La densité d'énergie critique Ec correspond à la quantité d'énergie minimale à apporter au système pour provoquer la photopolymérisation. En effet, selon l'équation de Jacobs, l'épaisseur polymérisée est nulle lorsque la densité d'énergie reçue en surface Ei est égale à Ec (Figure 38-a). L'épaisseur polymérisée augmente ensuite lorsque la densité d'énergie fournie au système est supérieure à Ec . La détermination de la valeur d' Ec permet donc d'évaluer et de comparer la réactivité des suspensions. Plus la valeur d' Ec est faible, moins la quantité d'énergie à fournir au système pour engendrer la polymérisation est élevée. Une faible valeur d' Ec témoigne donc d'une réactivité élevée de la suspension. Une photopolymérisation à partir d'une suspension peu réactive nécessite un apport énergétique important, c'est-à-dire un temps d'exposition long. Or, plus le temps d'exposition est élevé, moins la polymérisation est contrôlée, ce qui conduit à des pièces mal définies. Les suspensions utilisées doivent donc posséder une réactivité élevée, c'est-à-dire une valeur d' Ec la plus faible possible.

De plus, la densité d'énergie reçue à la surface de la suspension E_i est théoriquement proportionnelle au temps d'exposition t_{exp} (Figure 38-b). Il est donc possible, pour chaque suspension, de déterminer la valeur d' E_c à l'aide d'un test de réactivité consistant à mesurer l'épaisseur d'une couche polymérisée pour différents temps d'exposition (Figure 38-c).

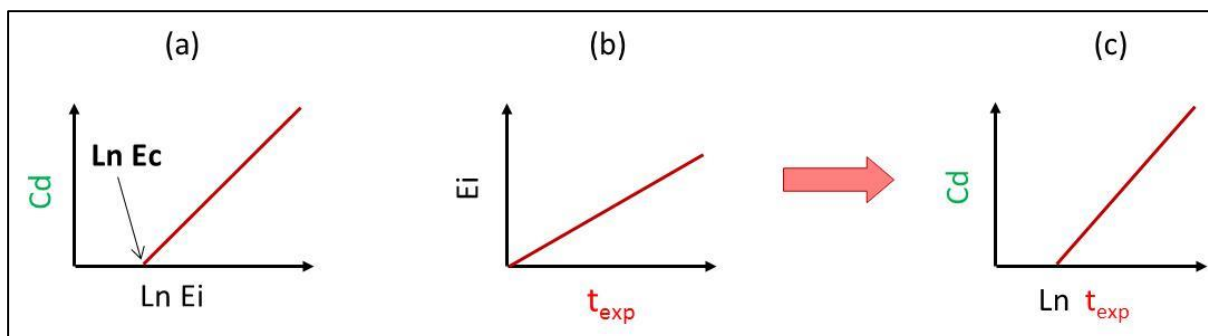


Figure 38 : Allures théoriques des représentations graphiques de l'équation de Jacobs (a), de la droite d'étalonnage (b) et du test de réactivité (c)

Expérimentalement, la suspension est placée dans un récipient en verre de profondeur 5 mm, de façon à ce que l'épaisseur de suspension ne soit pas limitante pour la profondeur de pénétration du faisceau. La surface de la suspension est lissée à l'aide d'une lame de verre et placée au niveau du plan focal de la lentille convergente (Figure 39). Le faisceau UV est projeté sur un masque de type carré plein. Une partie du faisceau est donc réorientée vers la suspension, à travers le système optique, de façon à polymériser une couche de surface carrée. La couche obtenue est retirée, rincée trois fois au monomère dans un bain à ultrasons, puis séchée une nuit à l'air, à température ambiante. Enfin, cinq mesures d'épaisseur sont effectuées sur la pièce à l'aide d'un micromètre (OTMT microextDigit, 0-25 mm), puis moyennées. Plusieurs temps d'exposition sont testés. Les épaisseurs mesurées C_d sont ensuite reportées sur un graphique, en fonction du logarithme du temps d'exposition t_{exp} (Figure 40 et Figure 41).

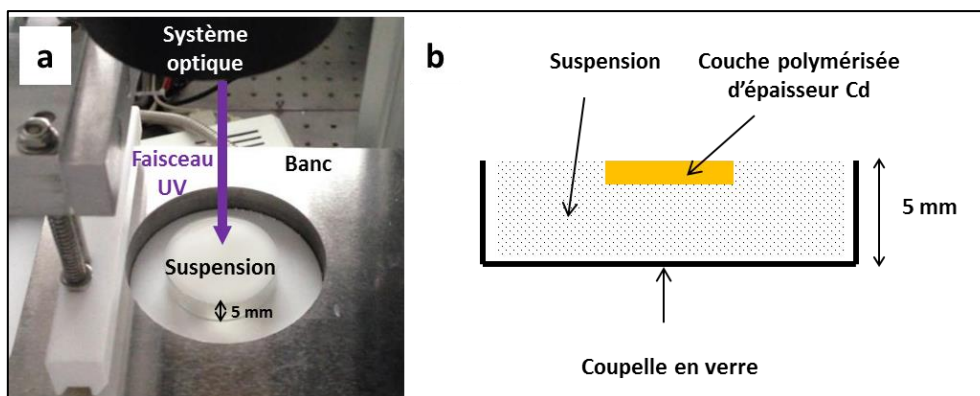


Figure 39 : Test de réactivité (a : photographie du montage ; b : schéma de la vue en tranche de la coupelle de verre contenant la suspension)

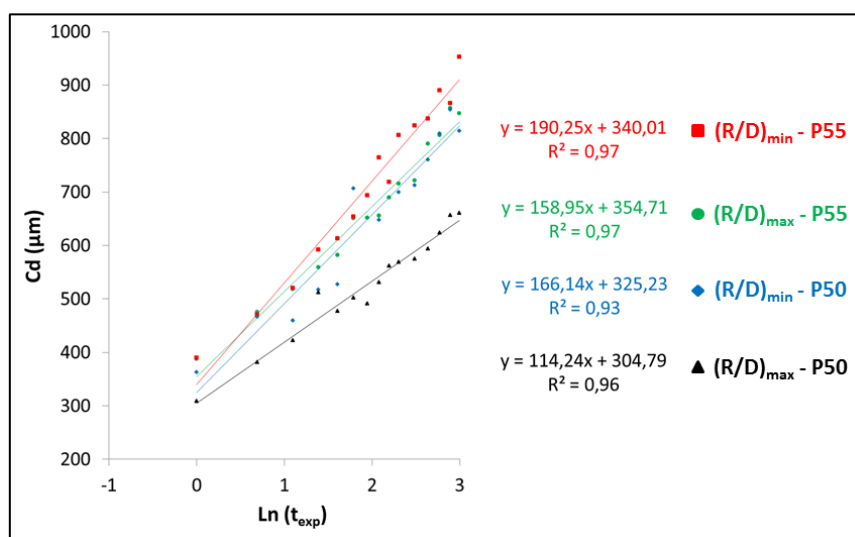


Figure 40 : Test de réactivité des suspensions passées une fois au tricylindre (épaisseurs mesurées Cd en fonction du logarithme du temps d'exposition t_{exp})

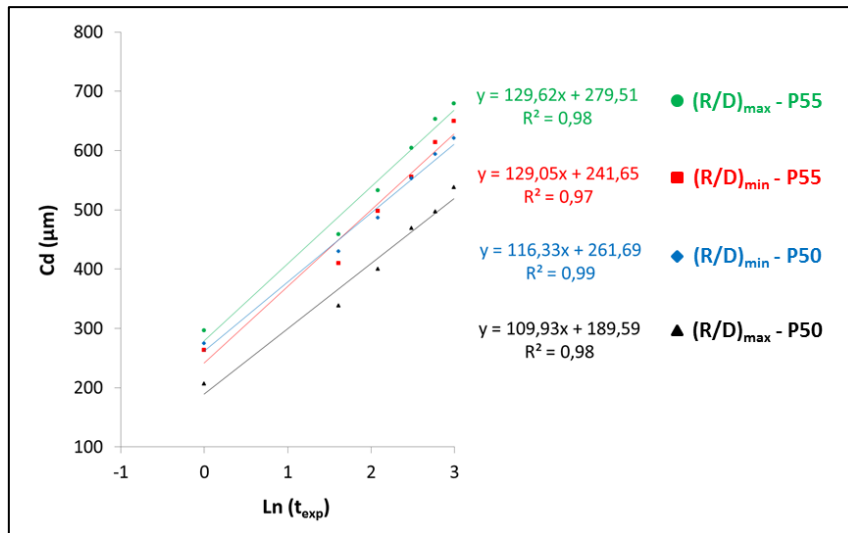


Figure 41 : Test de réactivité des suspensions passées cinq fois au tricylindre (épaisseurs mesurées Cd en fonction du logarithme du temps d'exposition $t_{\exp}$)

La droite d'étalonnage est obtenue en mesurant, pour différents temps d'exposition $t_{\exp}$, la densité d'énergie E_i reçue par un radiomètre UV (VLX-3W). Le radiomètre est muni d'une sonde de type cellule photoélectrique calibrée pour la zone spectrale des UV A (355 – 375 nm) et donc sensible à la longueur d'onde du faisceau irradiant (365 nm). Ce capteur est placé au niveau du plan focal image de la lentille, c'est-à-dire au niveau du plan supérieur du banc. Les valeurs de densité d'énergie E_i sont ensuite reportées, sur un graphique, en fonction du temps d'exposition $t_{\exp}$ (Figure 42). Une régression linéaire est obtenue à partir de ces données expérimentales. Enfin, les valeurs d'épaisseur Cd sont reportées, sur un graphique, en fonction des densités d'énergies E_i déterminées à partir de la droite d'étalonnage (Figure 43 et Figure 44).

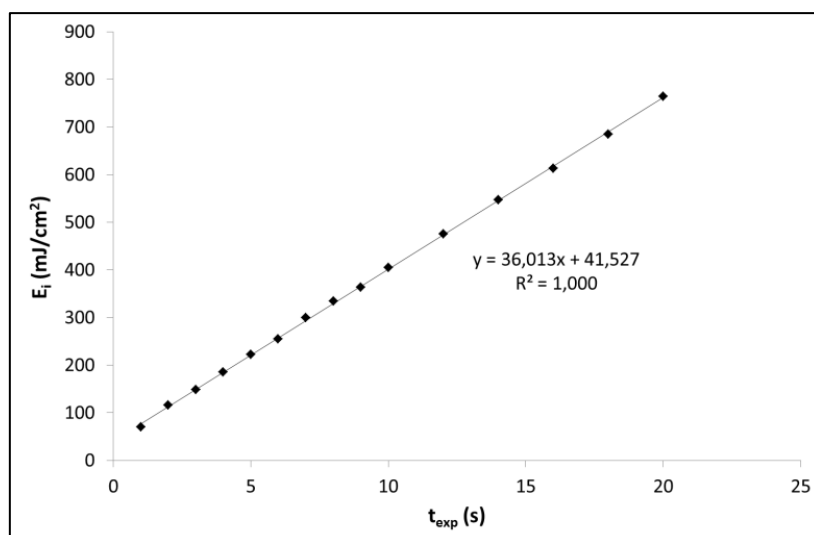


Figure 42 : Droite d'étalonnage du système d'irradiation UV (Valeurs expérimentales et régression linéaire)

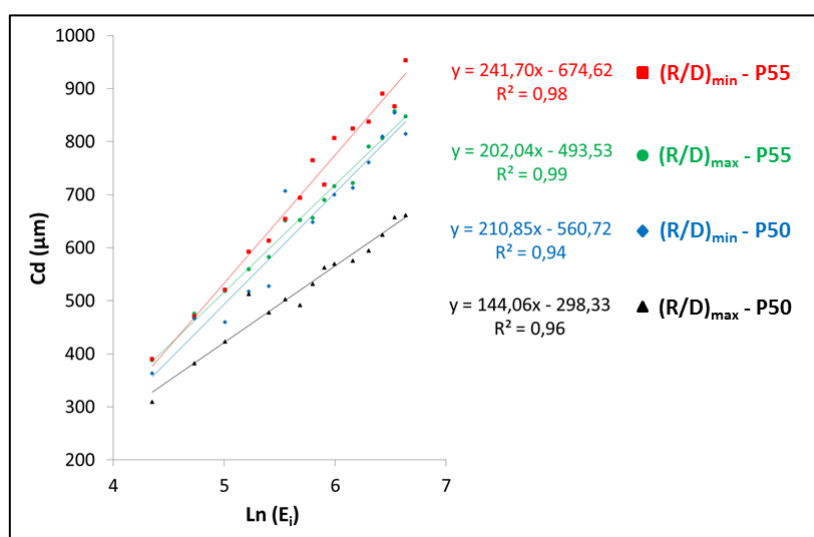


Figure 43 : Test de réactivité des suspensions passées une fois au tricylindre (épaisseurs mesurées Cd en fonction du logarithme de la densité d'énergie reçue E_i)

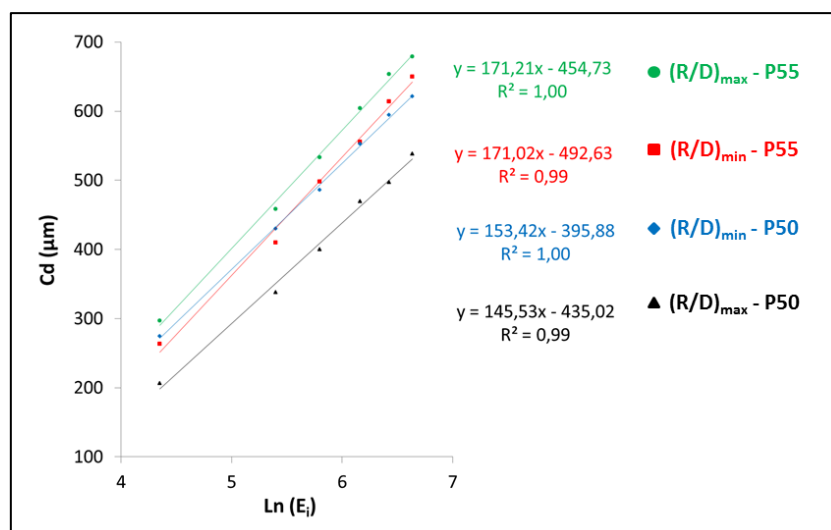


Figure 44 : Test de réactivité des suspensions passées cinq fois au tricylindre (épaisseurs mesurées C_d en fonction du logarithme de la densité d'énergie reçue E_i)

La linéarisation des résultats des tests de réactivité permet l'obtention des valeurs d' E_c de chaque suspension, par extrapolation (Tableau 20). La valeur du logarithme d' E_c correspond à l'abscisse du point d'intersection des droites représentatives des fonctions $C_d=f(\ln E_i)$ avec l'axe des abscisses (Figure 38-a).

Suspension	E_c (mJ/cm ²) (un passage au tricylindre)	E_c (mJ/cm ²) (cinq passages au tricylindre)
(R/D) _{min} - P50	14	13
(R/D) _{min} - P55	16	18
(R/D) _{max} - P50	8	20
(R/D) _{max} - P55	12	14

Tableau 20 : Energie critique E_c extrapolée, arrondie à l'unité, des suspensions passées une fois puis cinq fois au tricylindre, obtenue à partir de la linéarisation des résultats des tests de réactivité

Après un seul passage au tricylindre, les suspensions contenant peu de diluant semblent présenter une meilleure réactivité que les suspensions contenant un taux élevé de diluant, quel que soit le taux de charge. De plus, l'augmentation du taux de charge, à ratio résine/diluant fixé, provoque une élévation de la valeur d' E_c et donc une baisse de la réactivité de la suspension. Cependant, ces suspensions étant peu homogénéisées, les valeurs d' E_c obtenues ne sont pas représentatives du système. En effet, les coefficients de corrélation éloignés de 1 témoignent de résultats expérimentaux dispersés et éloignés du modèle linéaire

(Figure 43, Tableau 21). En revanche, après cinq passages au tricylindre, les modèles linéaires traduisent bien les résultats expérimentaux, avec des coefficients de corrélation proches de 1 (Figure 44, Tableau 21) et permettent donc une estimation correcte des valeurs d'Ec, par extrapolation. L'intérêt de cinq passages au tricylindre pour l'homogénéisation des suspensions, mise en évidence lors du test de réactivité, est en accord avec l'étude de l'évolution de la viscosité des suspensions avec les passages au tricylindre, présentée au paragraphe II.4.4.3a (p 99, Tableau 18).

Suspension	R^2	R^2
	(un passage au tricylindre)	(cinq passages au tricylindre)
(R/D) _{min} - P50	0,94	1,00
(R/D) _{min} - P55	0,98	0,99
(R/D) _{max} - P50	0,96	0,99
(R/D) _{max} - P55	0,99	1,00

Tableau 21 : Coefficient de corrélation, noté R^2 , du modèle linéaire établi entre l'épaisseur mesurée Cd et le logarithme de la densité d'énergie reçue Ei, pour les suspensions passées une fois puis cinq fois au tricylindre (Figure 43, Figure 44)

Les résultats du test de réactivité des suspensions passées cinq fois au tricylindre révèlent également une élévation de la valeur d'Ec avec l'augmentation du taux de charge, quel que soit le taux de diluant. En revanche, les valeurs d'Ec obtenues avec les deux valeurs de taux de diluant ne présentent pas de différence significative, quel que soit le taux de charge fixé. En effet, les différences de valeurs d'Ec sont du même ordre de grandeur que l'incertitude de mesure du radiomètre, évaluée à 3 mJ/cm², à partir de 10 mesures successives. La réactivité des suspensions est donc légèrement influencée par le taux de charge mais ne semble pas être affectée par le taux de diluant, en raison de la réactivité du diluant choisi pour les formulations.

c. Test de définition

Plusieurs pièces sont mises en forme à partir des quatre suspensions étudiées passées cinq fois au tricylindre, avec le masque présenté en Figure 45. Comme dans le cas du test de réactivité, la suspension est placée dans un récipient en verre de profondeur 5 mm, de façon à ce que l'épaisseur de suspension ne soit pas limitante pour la profondeur de pénétration du faisceau. La surface de la suspension est lissée à l'aide d'une lame de verre et placée au

niveau du plan focal de la lentille convergente (Figure 39). Après irradiation, les pièces monocouches obtenues sont retirées puis rincées trois fois au monomère dans un bain à ultrasons. Cette étape de nettoyage permet l'élimination de la suspension résiduelle non polymérisée présente en surface des échantillons et/ou dans les cavités des pièces et en particulier dans les angles. Si l'apparence du bain de monomère demeure trouble après le troisième rinçage, ce dernier est réitéré jusqu'à l'obtention d'une solution totalement limpide. Les pièces sont ensuite séchées une nuit à l'air, à température ambiante. Les photographies des pièces obtenues avec des temps d'exposition de 0,5 s, 1 s, 5 s et 8 s, pour les quatre suspensions sont présentées en Figure 45.

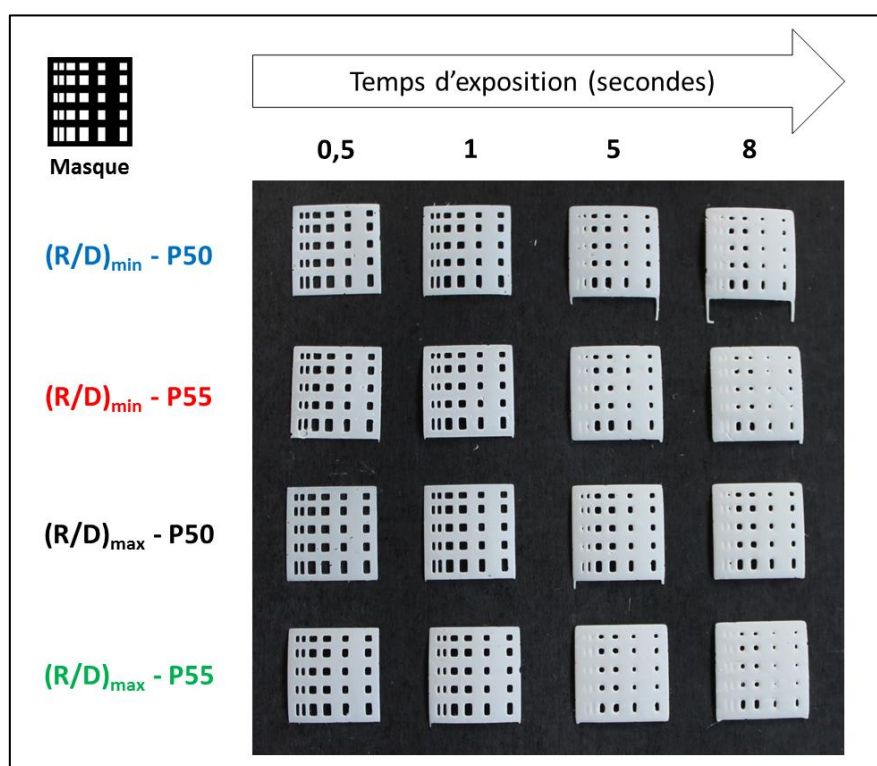


Figure 45 : Photographies des pièces monocouches réalisées avec quatre suspensions différentes et quatre temps d'exposition, à partir du même masque

L'analyse de ces photographies permet de mettre en évidence une dégradation de la définition des pièces avec l'augmentation du temps d'exposition. Les comparaisons des photographies entre les objets réalisés avec les différentes formulations sont donc effectuées avec des pièces mises en forme avec le même temps d'exposition, afin de s'affranchir de l'influence de ce paramètre sur la définition des échantillons.

Une analyse qualitative visuelle permet une première constatation : à taux de charge fixé, l'augmentation du taux de diluant engendre une légère dégradation de la définition. Par exemple, la suspension $(R/D)_{\max}$ -P50 conduit à une meilleure définition des pièces que la suspension $(R/D)_{\min}$ -P50 (Figure 46). De plus, une baisse de la rigidité des pièces crues avec l'augmentation du taux de diluant est constatée lors de la fabrication.

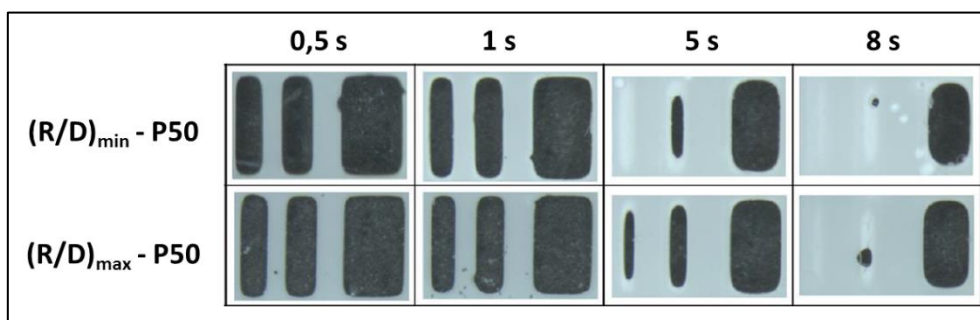


Figure 46 : Photographies de pièces mises en forme pour le test de définition : variation du ratio résine/diluant à taux de charge constant, pour différents temps d'exposition

Par ailleurs, à taux de diluant constant, une augmentation du taux de charge de 50 %vol à 55 %vol entraîne une dégradation de la définition, caractérisée par l'arrondissement des angles des géométries poreuses. Par exemple, la suspension $(R/D)_{\max}$ -P50 conduit à une meilleure définition des pièces que la suspension $(R/D)_{\max}$ -P55 (Figure 47). La dégradation de la définition est due au phénomène de diffusion du faisceau UV par les grains de céramique présents dans la suspension. Parmi les quatre formulations testées, la suspension $(R/D)_{\max}$ -P50 conduit à une meilleure définition des pièces mises en forme que les trois autres formulations. Mais les définitions observées sur ces géométries rectangulaires restent convenables pour l'ensemble des formulations testées, pour des temps d'exposition adaptés.

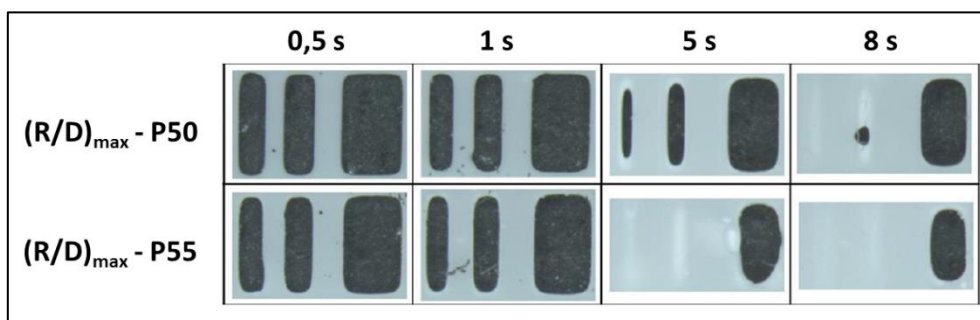


Figure 47 : Photographies de pièces mises en forme pour le test de définition : variation du taux de charge à ratio résine/diluant constant, pour différents temps d'exposition

d. Choix de la formulation

En vue du développement d'architectures complexes, les pièces crues doivent être non déformables et posséder une rigidité élevée. Le « squelette » des pièces crues est formé lors de la polymérisation de la résine, qui en assure les propriétés mécaniques. Un taux de résine élevé garantit, en théorie, une bonne tenue des pièces crues. De plus, d'après le test de définition, un taux de résine élevé conduit également à une bonne définition des pièces. Par conséquent, le taux de résine doit être le plus élevé possible afin d'assurer une bonne tenue mécanique et une bonne définition des pièces crues.

Le test de réactivité ayant montré une absence d'influence du ratio résine/diluant sur la réactivité, le seul paramètre limitant pour ce ratio est la viscosité. Or, les valeurs de viscosité mesurées sur les quatre suspensions passées cinq fois au tricylindre sont adaptées au procédé. Le ratio résine/diluant est donc choisi le plus élevé possible.

En ce qui concerne le taux de charge, il doit être le plus élevé possible pour assurer le maintien de l'architecture des pièces lors de l'évacuation du squelette organique, durant le traitement thermique. Cependant, une augmentation du taux de charge engendre une élévation de la viscosité des suspensions et une dégradation de la définition des pièces mises en forme. Comme il a été précisé précédemment, les valeurs de viscosité mesurées sur les quatre suspensions passées cinq fois au tricylindre sont adaptées au procédé, ce critère n'est donc pas limitant pour le choix du taux de charge.

Les phénomènes qui vont se produire durant le traitement thermique final de consolidation des pièces doivent également être pris en compte. Le Tableau 22 regroupe les valeurs de retrait linéaire obtenu avec un déliantage à 400°C pendant 0,1 h suivi d'un frittage à 1220°C pendant 2 h (Figure 67, p 130), moyennées sur sept pièces identiques, pour chaque formulation. Le retrait linéaire est déterminé par mesures des pièces crues et frittées à partir de micrographies. Le retrait linéaire est d'environ 18 % pour les pièces mises en forme avec des suspensions chargées à 50 %vol alors qu'il n'est que de 16 % dans le cas des suspensions chargées à 55 %vol, quel que soit le ratio résine/diluant. La valeur de la différence de retrait volumique peut être extrapolée en multipliant par 2,5 ou 3 la valeur de la différence de retrait linéaire qui est de 2 %. Ce calcul approximatif conduit à une différence de retrait volumique de 5-6 %. Ce résultat est cohérent avec l'augmentation de 5 %vol du taux de charge initial en

poudre céramique. Une élévation du taux de charge de 50 %vol à 55 %vol permet donc d'abaisser le retrait linéaire dû au traitement thermique de 18 % à 16 % et est donc susceptible de minimiser les déformations des pièces lors du traitement thermique.

Suspensions	Taux de charge (%vol)	Retrait linéaire moyen sur sept échantillons (%)
(R/D) _{min} - P50	50	18,4 ± 0,3
(R/D) _{min} - P55	55	16,0 ± 0,3
(R/D) _{max} - P50	50	17,7 ± 0,6
(R/D)_{max} - P55	55	15,7 ± 0,2

Tableau 22 : Retrait linéaire obtenu avec un déliantage à 400°C pendant 0,1 h suivi d'un frittage à 1220°C pendant 2 h, (valeurs moyennes obtenues avec sept échantillons)

Par conséquent, le choix de la formulation des suspensions résulte principalement d'un compromis entre réactivité et taux de charge élevés des suspensions et définition élevée des pièces. La formulation retenue pour la suite des travaux présentés dans cette étude est la (R/D)_{max}-P55, possédant un ratio résine/diluant le plus élevé pour un taux de charge de 55 %vol de poudre céramique.

II.5 Elaboration d'échantillons SiHA macro-micro-poreux

II.5.1 Maîtrise de la macroporosité par microstéréolithographie

L'objectif de cette partie est la mise en forme d'échantillons possédant des macropores de différentes tailles et de géométries variées et l'évaluation de l'impact du procédé sur la définition de ces pores. Les céramiques sont mises en forme par μ SL à partir de la suspension (R/D)_{max}-P55 (Tableau 17, p 99) retenue suite à l'étude des formulations (paragraphe II.4.4). Cinq géométries de macropores, et trois tailles pour chacune d'elles, sont étudiées selon le modèle du masque présenté en Figure 48.

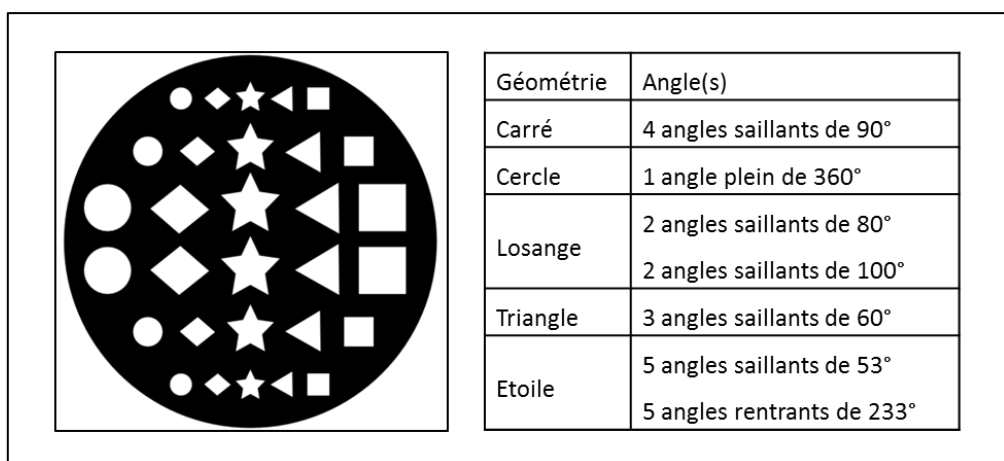


Figure 48 : Illustration et caractéristiques des géométries étudiées

Le Tableau 23 regroupe les différents termes utilisés pour décrire les dimensions des macropores sur le masque et sur les pièces mises en forme. Les dimensions théoriques des pores selon le modèle du masque, pour les 15 géométries étudiées, sont précisées dans le Tableau 24.

Paramètre dimensionnel	Description
S_0	Surface réelle du pore (sur la pièce mise en forme)
S_{th}	Surface théorique du pore (selon le modèle du masque)
D_{eq}	Diamètre du cercle de surface équivalent à celle du pore

Tableau 23 : Paramètres dimensionnels utilisés pour la description des géométries des macropores

Géométrie	Grande dimension		Dimension moyenne		Petite dimension	
	$S_{th} (mm^2)$	$D_{eq} (\mu m)$	$S_{th} (mm^2)$	$D_{eq} (\mu m)$	$S_{th} (mm^2)$	$D_{eq} (\mu m)$
Carré	1,81	1517	0,68	927	0,38	694
Cercle	1,34	1305	0,53	822	0,30	615
Losange	1,11	1189	0,40	717	0,23	537
Triangle	0,88	1057	0,56	844	0,22	526
Etoile	1,15	1209	0,75	978	0,29	612

Tableau 24 : Dimensions théoriques des pores selon le modèle du masque, pour les 15 géométries étudiées

II.5.1.1 Détermination des paramètres du procédé

Afin de mettre en forme des objets multicouches, les paramètres du procédé à fixer, pour une suspension donnée, sont le temps d'exposition et l'épaisseur de couche, c'est-à-dire l'épaisseur de suspension étalée. Ces deux paramètres peuvent être déterminés à partir de la regression linéaire obtenue avec les données expérimentales issues du test de réactivité décrit au paragraphe II.4.4.3.b (p 102). Sur la Figure 49, sont reportées les épaisseurs polymérisées Cd, en fonction du logarithme du temps d'exposition t_{exp} .

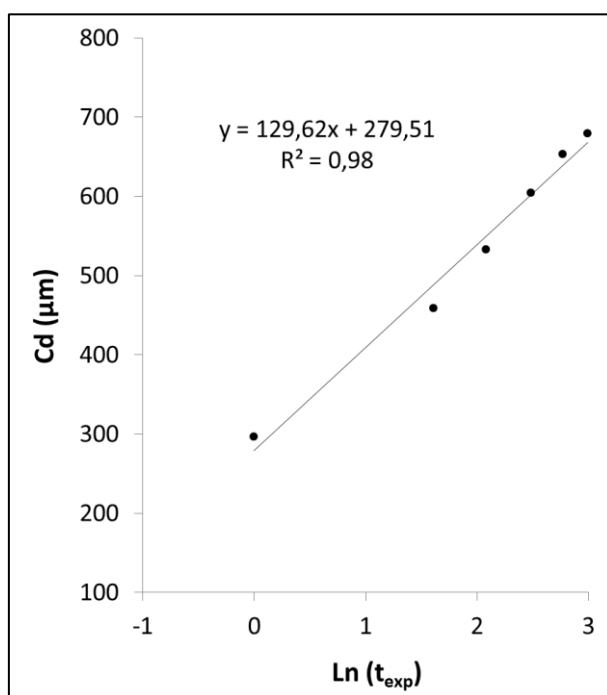


Figure 49 : Epaisseurs polymérisées Cd, reportées en fonction du logarithme du temps d'exposition t_{exp} , et régression linéaire

Selon le modèle linéaire établi à partir de ces données expérimentales, à un temps d'exposition de 0,83 s, par exemple, correspond une épaisseur polymérisée de 255 µm. En fixant ce temps d'exposition de 0,83 s et une épaisseur de suspension étalée de 255 µm, l'objet obtenu après polymérisation couche par couche consiste en un empilement de couches non adhérentes les unes aux autres (Figure 50).

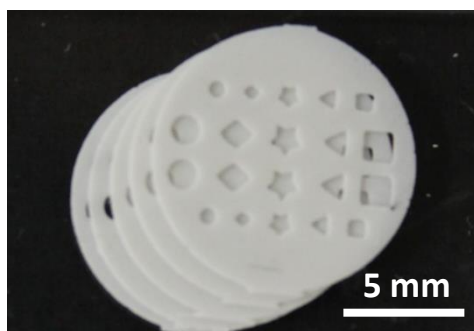


Figure 50 : Photographie d'une pièce crue de 5 couches, vue de dessus, réalisée par microstéréolithographie avec un temps d'exposition de 0,83 s et une épaisseur de suspension étalée de 255 μm (couches non adhérentes)

Il est donc nécessaire de réduire l'épaisseur des couches de suspension étalée par rapport à la valeur de l'épaisseur polymérisée, d'une part pour compenser le léger retrait dû à la polymérisation et d'autre part pour engendrer une légère surpolymérisation verticale à l'interface entre les couches et permettre l'adhérence de ces dernières.

Cependant, la surexposition imposée provoque également une légère surpolymérisation latérale qui affecte la définition des géométries réalisées. Plus l'épaisseur de couche étalée est réduite par rapport au modèle obtenu avec le test de réactivité, plus la surpolymérisation latérale est importante. Une surpolymérisation latérale trop élevée peut conduire à l'obstruction partielle voire complète des géométries poreuses (Figure 51).

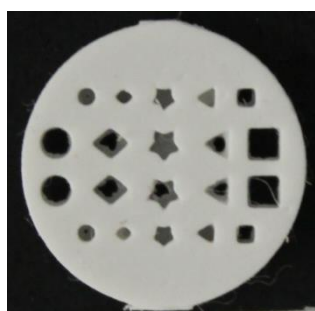


Figure 51 : Photographie d'une pièce crue de 5 couches, vue de dessus, réalisée par microstéréolithographie avec un temps d'exposition de 0,83 s et une épaisseur de suspension étalée réduite pour une couche, conduisant à l'obstruction partielle des macropores

Une diminution minimale de 5 μm de l'épaisseur étalée, par rapport à l'épaisseur nominale polymérisée, est nécessaire. Ainsi, en conservant le temps d'exposition de 0,83 s et en fixant l'épaisseur de suspension étalée à 250 μm au lieu de 255 μm , les couches adhèrent parfaitement entre elles (Figure 52). Ces paramètres permettent donc de mettre en forme une pièce 3D conforme à l'architecture souhaitée.

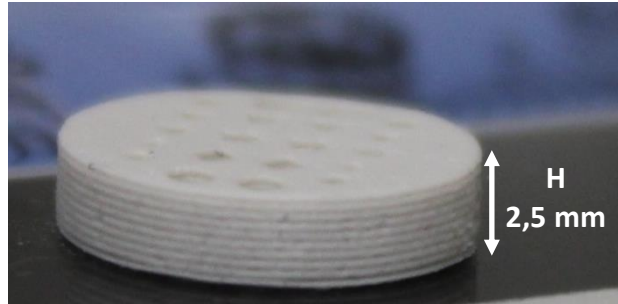


Figure 52 : Photographie d'une pièce crue de 10 couches, réalisée par microstéréolithographie avec un temps d'exposition de 0,83 s et une épaisseur de suspension étalée de 250 μm (couches adhérentes)

La surpolymérisation, qui affecte directement la définition géométrique, doit être quantifiée, pour ces paramètres du procédé donnés. Cette quantification doit permettre de déterminer les géométries et les dimensions réalisables dans ces conditions de mise en forme et éventuellement d'adapter les masques et/ou les paramètres du procédé, aux géométries finales souhaitées. La quantification de la surpolymérisation fait l'objet du paragraphe suivant.

II.5.1.2 Quantification de la surpolymérisation

Afin de minimiser les effets d'ombres sur les micrographies, la quantification de la surpolymérisation est effectuée sur une pièce monocouche. L'éventuelle incidence, sur la définition latérale, de la surpolymérisation verticale à l'interface entre les couches, est donc ici négligée.

La surpolymérisation peut être quantifiée à l'aide d'un traitement d'image. Sur la Figure 53-a, est reportée l'image d'un exemple de masque. Les pixels noirs du masque correspondent aux zones destinées à être irradiées et donc polymérisées et les pixels blancs

aux futures zones vides. Sur la Figure 53-b, est présentée une micrographie d'une pièce monocouche réalisée à partir de ce masque, prise de dessus sur fond noir. Les deux fichiers images sont ouverts sur le logiciel Photoshop CS6. Les pixels noirs du masque sont sélectionnés et collés sur un calque appelé « calque M ». Le calque M est ensuite superposé à l'image de la pièce, de façon à faire apparaître uniquement les zones surpolymérisées (Figure 53-c). Les zones surpolymérisées ainsi détectées sont sélectionnées et colorées (Figure 53-d) puis copiées et collées sur un nouveau calque appelé « calque S » (Figure 53-e).

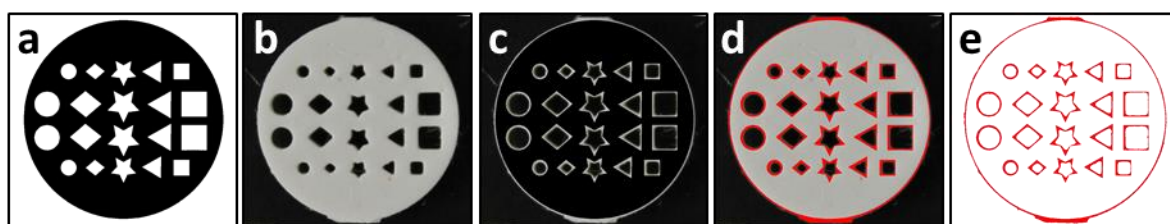


Figure 53 : Détection de la surpolymérisation par traitement d'image : a) image du masque (calque M), b) image de la pièce, c) superposition du calque M sur l'image de la pièce, d) coloration en rouge de la zone surpolymérisée sur la pièce, e) calque S

La surpolymérisation notée S, exprimée en %, peut alors être calculée selon l'Équation 13. Elle est obtenue en faisant le rapport de la surface surpolymérisée, c'est-à-dire la surface colorée du calque S en px^2 (en rouge sur la Figure 53-e) sur la surface vide théorique, c'est-à-dire la surface non colorée du calque M en px^2 (en blanc sur la Figure 53-a). Les surfaces réelles des macropores obtenus en cru, après mise en forme par μSL , peuvent ensuite être déduites de la surpolymérisation, à l'aide de l'Équation 14. Les résultats exprimés en px^2 peuvent être ensuite convertis en unité de surface (par exemple mm^2) grâce à l'échelle des micrographies.

Les images présentées en Figure 53 sont données à titre d'exemple illustratif. La quantification est effectuée, pour chaque macropore, à partir d'une micrographie de la zone du macropore et non sur une photographie d'ensemble de la pièce, de façon à s'affranchir des effets d'ombre projetée sur une prise de vue globale. Un exemple de calcul de surpolymérisation à partir d'un traitement d'image d'une micrographie de macropore, est présenté en Figure 54.

$$S = \frac{A \text{ surpolymérisée}}{A \text{ vide théorique}} \times 100$$

Équation 13 : Calcul de la surpolymérisation notée S (A surpolymérisée = surface surpolymérisée en μm^2 ; A vide théorique = surface vide théorique en μm^2)

$$A \text{ réelle} = \frac{100 - S}{100} \times A \text{ vide théorique}$$

Équation 14 : Calcul de la surface réelle d'un macropore obtenu en cru, notée A réelle, à partir de la surpolymérisation, notée S , et de la surface théorique du pore, notée A vide théorique

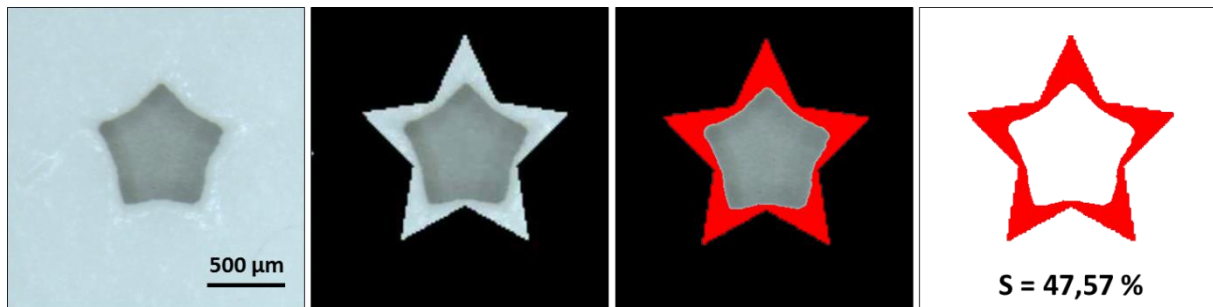


Figure 54 : Calcul de la surpolymérisation à partir de traitement d'image, pour un macropore en forme d'étoile

II.5.1.3 Effet de la surpolymérisation sur la taille des macropores

Sur le graphique présenté en Figure 55, est reportée la surpolymérisation des macropores d'une pièce monocouche crue en fonction des surfaces théoriques respectives de ces pores sur le masque, pour les géométries de pores définies en Figure 48 (p 113). Chaque point correspond à la moyenne des valeurs obtenues sur deux pores théoriquement identiques. La pièce est réalisée avec un temps d'exposition de 0,83 s et une épaisseur de couche étalée de 250 μm . Quelle que soit la géométrie du pore, la surpolymérisation croît avec la diminution de la taille des pores, en très bonne corrélation avec une loi de puissance.

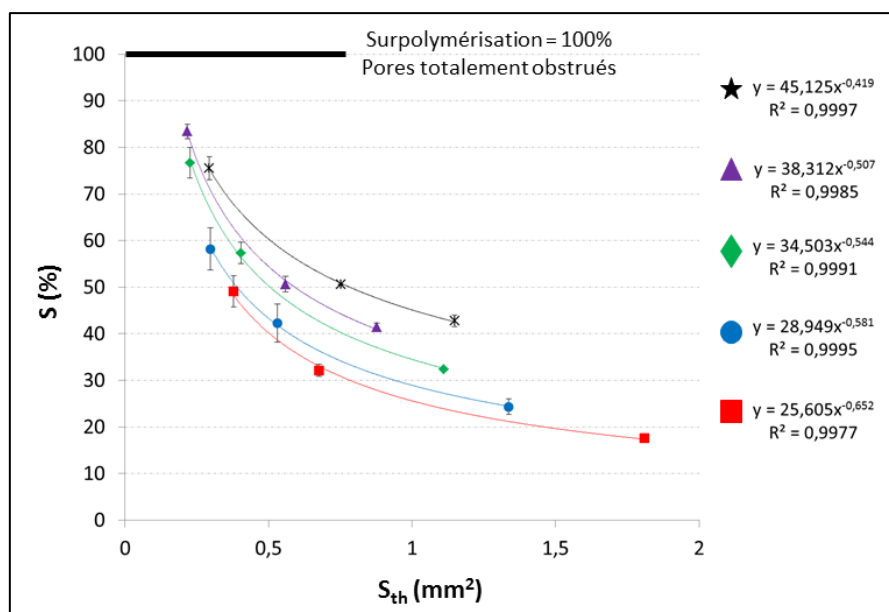


Figure 55 : Evolution de la surpolymérisation S d'un pore d'une pièce crue monocouche en fonction de la surface théorique S_{th} du pore selon le modèle du masque, pour cinq géométries de pores

La transformée logarithmique permet de linéariser les relations obtenues (Figure 56). Les dimensions théoriques limites des pores sur le masque, à partir desquelles les pores sont totalement obstrués ($S = 100\%$), sont déterminées par extrapolation linéaire (Figure 57). Les logarithmes des surfaces minimales théoriques correspondent aux abscisses des points d'intersection des droites représentatives de ces relations linéaires avec la droite d'équation $y = \ln(100)$ (Figure 58). Pour chaque géométrie étudiée, les valeurs limites de surface S_{th} et de diamètre équivalent D_{eq} théoriques selon le modèle du masque, en dessous desquelles les pores sont totalement obstrués lors de la mise en forme, sont reportées dans le Tableau 25. Enfin, ces points d'intersection convergent globalement vers une zone très resserrée (Figure 58).

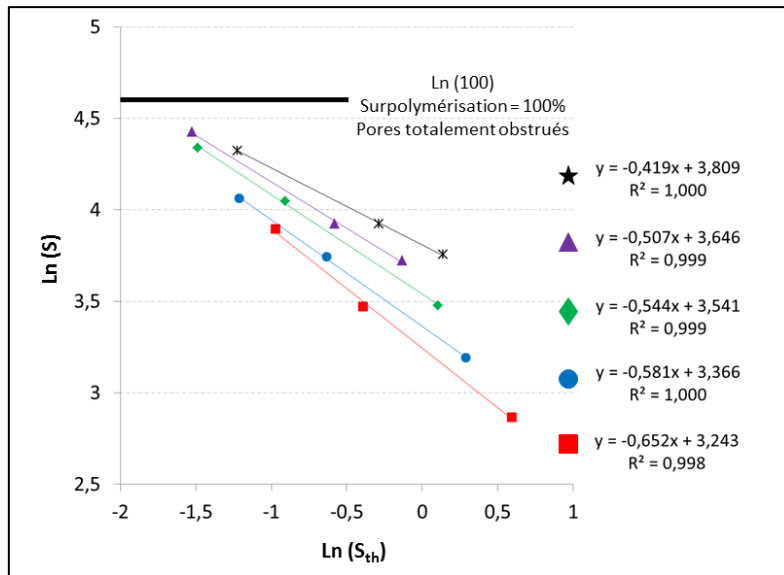


Figure 56 : Evolution de la surpolymérisation S d'un pore d'une pièce crue monocouche en fonction de la surface théorique S_{th} du pore selon le masque, pour cinq géométries de pores (transformée logarithmique)

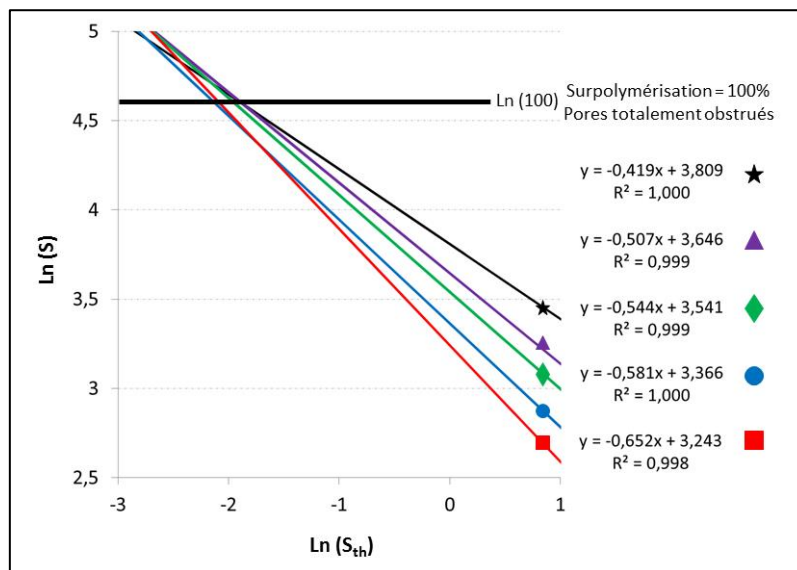


Figure 57 : Extrapolation linéaire de l'évolution de la surpolymérisation S d'un pore d'une pièce crue monocouche en fonction de la surface théorique S_{th} du pore selon le masque, pour cinq géométries de pores

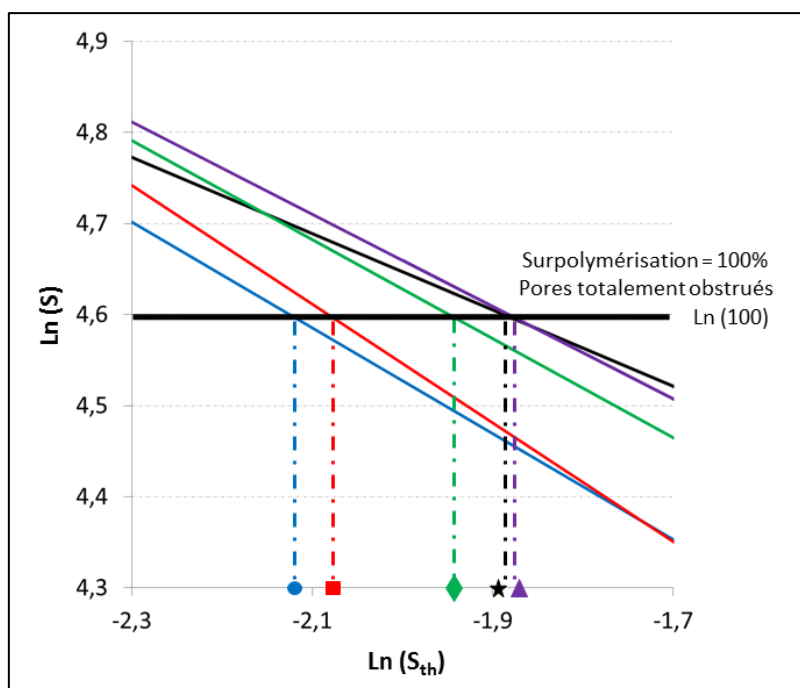


Figure 58 : Extrapolation linéaire de l'évolution de la surpolymérisation S d'un pore d'une pièce crue monocouche en fonction de la surface théorique S_{th} du pore selon le masque, pour cinq géométries de pores : zoom sur la zone de convergence de la Figure 57

Géométrie de macropore	$\text{Ln}(S_{th})$ limite	S_{th} limite (mm^2)	D_{eq} limite (μm)
Etoile	-1,899	0,150	437
Triangle	-1,893	0,151	438
Losange	-1,958	0,141	424
Cercle	-2,134	0,118	388
Carré	-2,090	0,124	397

Tableau 25 : Valeurs de surface S_{th} et de diamètre équivalent D_{eq} théoriques des pores selon le modèle du masque, en dessous desquelles les macropores sont totalement obstrués lors de la mise en forme, pour chaque géométrie étudiée

Les valeurs reportées dans le Tableau 25 sont de l'ordre de 400 μm quelle que soit la géométrie. Elles correspondent aux dimensions théoriques des pores selon le modèle du masque. Les dimensions réelles des pores sont toujours inférieures aux dimensions théoriques du masque, en raison du phénomène de surpolymérisation. Les valeurs réelles des surfaces S_0 des macropores obtenus en cru, calculées à l'aide de l'Équation 14, sont reportées sur la

Figure 59, en fonction des surfaces théoriques S_{th} des pores selon le masque, pour les différentes géométries. Par exemple, pour élaborer un macropore carré de longueur de côté 200 μm en cru, soit une surface souhaitée de 0,040 mm^2 , la surface théorique S_{th} du carré sur le masque doit être de 0,254 mm^2 , c'est-à-dire un carré de longueur de côté 504 μm (et de D_{eq} 569 μm).

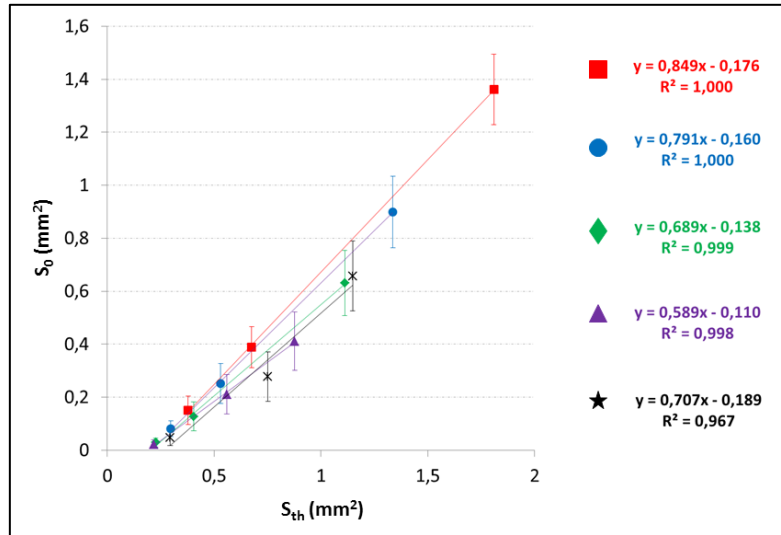


Figure 59 : Valeurs réelles des surfaces S_0 des macropores (en mm^2) obtenus en cru en fonction de la surface théorique S_{th} des pores sur le masque (en mm^2)

Les relations linéaires, établies entre la surface réelle S_0 du macropore en cru et la surface théorique S_{th} du macropore selon le masque, définissent donc un modèle prédictif permettant le dimensionnement des masques. Les masques étant définis en pixels sur le logiciel de pilotage, ce modèle peut être directement transposé en px^2 pour leur dimensionnement, selon les dimensions réelles des pores souhaitées sur la pièce en cru (Figure 60). En prenant l'exemple d'un macropore carré de longueur de côté 669 μm en cru, la surface du carré sur le masque doit être de 3364 px^2 et la longueur de son côté de 58 px. Un modèle prédictif similaire a été proposé par Lee *et al.* [240] pour la mise en forme de géométries poreuses carrées et hexagonales en polymère par stéréolithographie de type balayage vectoriel.

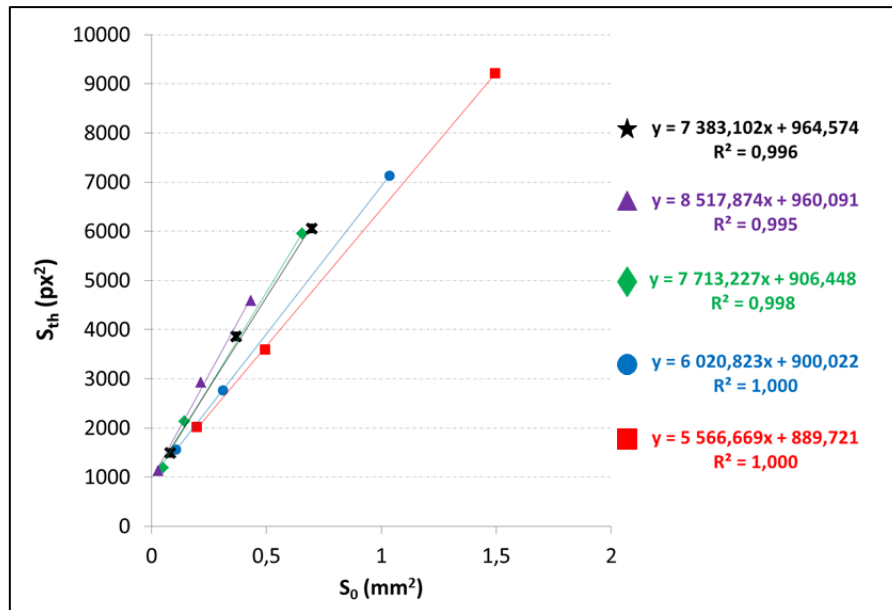


Figure 60 : Surface théorique des pores S_{th} (en px^2) sur le masque de $1024 \times 768 px^2$ en fonction des valeurs réelles des surfaces S_0 des macropores obtenus en cru (en mm^2)

II.5.1.4 Effet de la géométrie des macropores sur la définition

Selon la Figure 59, l'évolution de la surface réelle du macropore sur la pièce crue, en fonction de la surface théorique du pore sur le masque, peut être modélisée par une relation linéaire avec une corrélation forte, pour des géométries de pores circulaires ou carrées. Mais les coefficients de corrélation R^2 , correspondant aux relations linéaires établies pour différentes géométries de pores, reportés dans le Tableau 26, témoignent d'un éloignement au modèle linéaire pour des géométries comportant des angles saillants et plus particulièrement des angles aigus. Cet écart au modèle linéaire semble croître avec la présence d'angles aigus dans la géométrie. Le modèle prédictif, établi au paragraphe précédant, se révèle donc être plus précis pour des géométries simples comportant peu d'angles aigus.

Géométrie du macropore	Angle(s)	R^2
Carré	4 angles saillants de 90°	1,000
Cercle	1 angle plein de 360°	1,000
Losange	2 angles saillants de 80°	0,998
	2 angles saillants de 100°	
Triangle	3 angles saillants de 60°	0,995
Etoile	5 angles saillants de 53°	0,996
	5 angles rentrants de 233°	

Tableau 26 : Coefficient de corrélation, noté R^2 , du modèle linéaire établi entre la surface réelle S_0 du macropore sur la pièce crue et la surface théorique S_{th} du macropore selon le masque, pour chaque géométrie

La Figure 58 (p 121), qui présente un agrandissement de la Figure 57, focalisé sur la zone d'obstruction théorique des pores, met en évidence l'effet de la géométrie des pores. La valeur limite de surface de pore théorique S_{th} sur masque, correspondant à l'obstruction ($S = 100\%$), est plus rapidement atteinte pour les géométries comportant des angles aigus (triangle, losange et étoile) ($\approx 0,15\text{ mm}^2$) que pour les géométries circulaires ou carrées ($\approx 0,12\text{ mm}^2$) (Tableau 25).

Enfin, à surface de pore théorique S_{th} identique sur le masque, la surpolymérisation est plus élevée pour les géométries comportant des angles aigus (triangle, losange et étoile) (Figure 55, p 119). Le phénomène de surpolymérisation est donc favorisé par la présence d'angles aigus dans les géométries des pores et l'amplitude de ce phénomène semble croître avec la diminution de la valeur des angles. Afin de vérifier cette hypothèse, la surpolymérisation est mesurée à l'intérieur des angles saillants de chaque géométrie, après découpe des angles théoriques du masque à surface identique (Figure 61). Les résultats, présentés dans le Tableau 27, confirment l'augmentation de la surpolymérisation avec la diminution de la valeur des angles saillants.

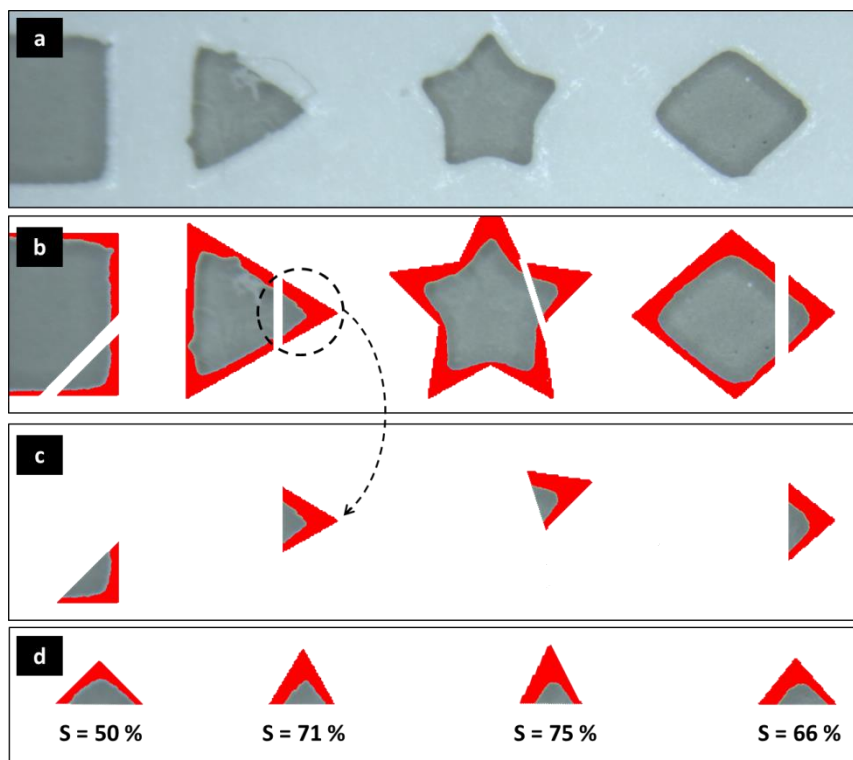


Figure 61 : Détermination de la surpolymérisation à l'intérieur des angles : photographie de la pièce (a), coloration de la surpolymérisation et découpe des angles à surface identique (b), extraction des angles de surface égale (c), calcul de la surpolymérisation dans les angles (d)

Mesure de l'angle saillant théorique sur masque (°)	Surpolymérisation (%)
53 (étoile)	75
60 (triangle)	71
80 (losange)	66
90 (carré)	50
100 (losange)	47

Tableau 27 : Valeurs de surpolymérisation mesurées au sein des angles saillants, en cru

La définition des angles est d'autant plus faible qu'ils sont aigus. La surpolymérisation provoque, un arrondissement des angles et l'amplitude de ce phénomène croît avec la diminution de la taille des pores (Figure 62). Visuellement, les géométries étudiées tendent toutes vers une forme sensiblement circulaire avec la diminution de la taille de pore (Figure 62), ce qui explique la convergence des valeurs limites remarquée en Figure 57 et Figure 58. Il y a donc une gamme de taille de pores pour laquelle les géométries sont similaires et mal définies, en particulier pour les géométries comportant de petits angles. Cependant, les géométries restent bien définies pour des pores de D_{eq} supérieurs à 300 μm , ce qui correspond

à la gamme de taille de macropores intéressante pour l'application visée dans la présente étude.

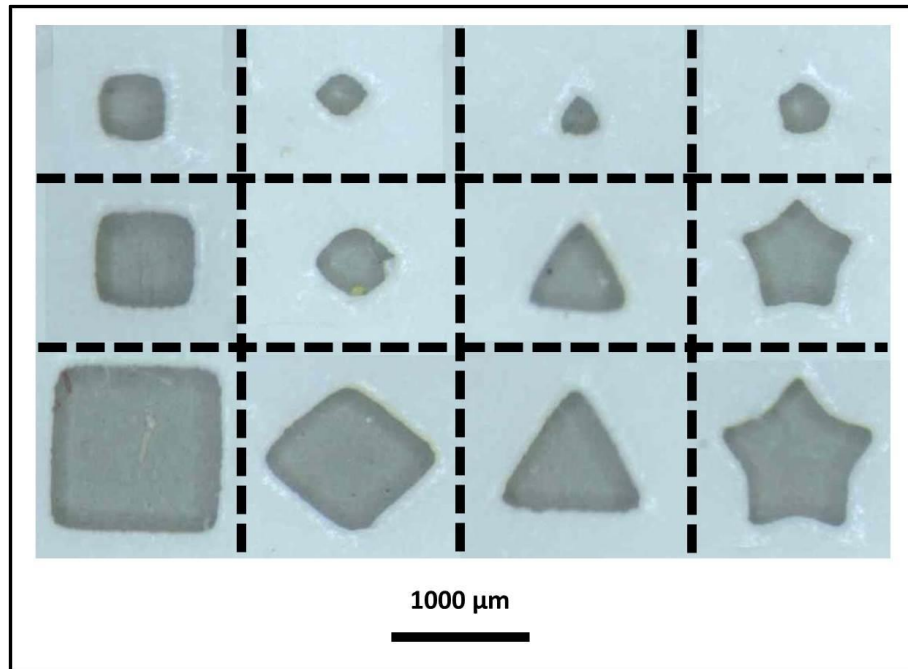


Figure 62 : Micrographies optiques de géométries macroporeuses bidimensionnelles mises en forme par microstéréolithographie, pièces en cru avant traitement thermique

II.5.2 Maîtrise de la microporosité par frittage

La mise en forme par microstéréolithographie conduit à des pièces crues composites. La phase organique de ces composites est éliminée lors d'un traitement thermique lent à basse température, appelé déliantage. La consolidation de l'architecture céramique s'effectue à plus haute température, par frittage.

Le frittage peut être décrit comme « le passage d'un compact pulvérulent à un matériau cohérent sous l'action de la chaleur » (Techniques de l'Ingénieur AF6620⁸). La coalescence des grains correspond à la consolidation du matériau par soudure entre ces derniers, sans modification de la densité du matériau. Le phénomène de densification, souvent

⁸ AF6620 : Techniques de l'Ingénieur : Frittage : aspects physico-chimiques -- Partie 1 : frittage en phase solide

observé lors du frittage, traduit une augmentation de la densité du matériau. Ce phénomène est dû à la coalescence des grains et à l'élimination de la porosité délimitée par ces grains. Le taux de densification, ou densité relative, est défini comme le rapport de la densité d'un échantillon, mesurée expérimentalement, sur la densité théorique de l'échantillon supposé totalement dense, c'est-à-dire ne comportant aucune porosité. La densité relative croît avec l'augmentation de la température et avec la durée du frittage (Figure 63). Le processus conduisant à l'augmentation du taux de densification peut être décomposé en trois étapes. L'étape primaire consiste à la formation des ponts entre les grains assurant une cohésion et une tenue mécanique au matériau. La seconde étape, dite intermédiaire, se traduit par la diminution jusqu'à l'élimination de la porosité ouverte. Enfin, l'étape ultime correspond à la réduction, voire à l'élimination, de la porosité fermée.

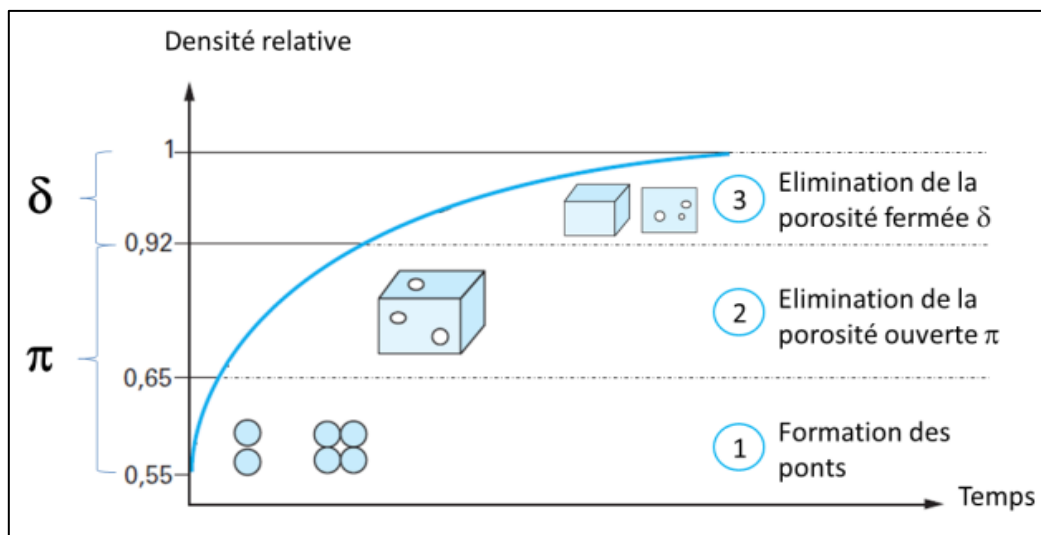


Figure 63 : Evolution de la densité relative au cours des étapes de densification, lors du frittage (Techniques de l'Ingénieur AF6620)

L'objectif de la présente étude étant la maîtrise du taux de microporosité ouverte par le frittage, ce contrôle doit se faire lors de l'étape intermédiaire du frittage (étape n°2 de la Figure 63), par choix des paramètres température et durée de palier.

II.5.2.1 Deliantage

L'analyse thermogravimétrique, réalisée dans les conditions décrites dans l'annexe VI.1, avec une rampe de montée en température de 10°C/min, sur une pièce crue monocouche

mise en forme par microstéréolithographie à partir d'un masque de type carré plein, est présentée en Figure 64. La suspension utilisée pour la mise en forme de l'échantillon comporte un taux de charge volumique en poudre céramique de 55%, soit un taux de charge massique de 78 %. Le pourcentage massique de phase organique de la pièce crue est donc d'environ 22 %. Les échantillons n'étant pas séchés avant l'analyse, la perte de masse d'environ 3 % observée entre 100°C et 150°C peut s'expliquer par le départ de l'eau adsorbée à la surface de l'échantillon. La perte de masse maximale mesurée est de 28 % et la perte de masse mesurée à 400°C est de 25 %. Ces résultats permettent donc de situer la gamme de température de décomposition de la phase organique entre 150 et 400°C. Une montée lente en température (fixée à 1°C/min) jusqu'à 400°C permet donc l'élimination progressive de la phase organique tout en conservant l'organisation des grains de céramique selon l'architecture initialement définie par le polymère.

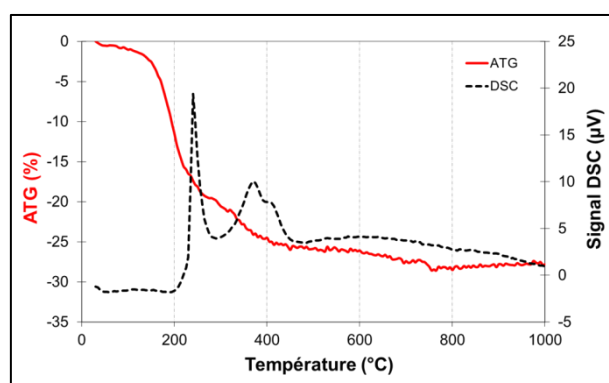


Figure 64 : Courbes d'analyse thermogravimétrique (ATG) et de signal DSC d'un échantillon mis en forme par microstéréolithographie

Le déliantage conduit à des empilements granulaires céramiques non consolidés. Une seconde étape de traitement thermique, à plus haute température, permet la consolidation de l'architecture céramique. Il s'agit du frittage. C'est lors de cette étape que la microporosité des échantillons peut être contrôlée.

II.5.2.2 Frittage

Des pièces crues en SiHA de cinq couches sont mises en forme par microstéréolithographie avec un temps d'exposition de 0,83 s et une épaisseur de suspension étalée de 250 µm, selon un modèle de masque de type carré plein.

Le frittage des pièces est suivi sur un dilatomètre horizontal, dans les conditions décrites en annexe VI.2. Trois cycles thermiques différents sont appliqués (Figure 65). Ils comportent une montée lente en température jusqu'à 400°C permettant d'évacuer la phase organique, suivie d'un cycle de frittage avec une montée plus rapide en température jusqu'à une température de palier maintenue durant 4 h.

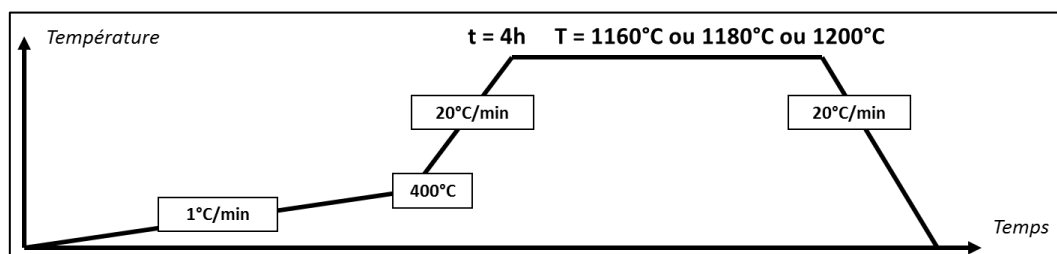


Figure 65 : Cycles thermiques suivis par dilatométrie

La Figure 66 présente les courbes de retrait et de température obtenues, en fonction du temps, lors de l'étape de frittage. Dans le Tableau 28, sont reportées les variations d'épaisseur mesurées, pour les trois températures étudiées, entre le début du palier de frittage et une durée de 2 h. Les différences de retrait linéaire, pour cette durée de frittage de deux heures, enregistrées entre les trois températures de frittage testées (1160, 1180 et 1200°C), sont significatives. Une variation de température pour une durée de frittage fixée à 2 h doit donc permettre une variation de taux de microporosité ouverte sur un large intervalle. De plus, la variation de retrait observée autour de deux heures de frittage, mesurée sur un intervalle de 10 minutes entre 1 h 55 min et 2 h 05 min, représente moins de 2 % du retrait à 2 h (Tableau 28). Les faibles fluctuations dimensionnelles observées autour de deux heures de frittage, pour les trois températures de frittage, assurent une bonne reproductibilité des résultats pour une durée de frittage de 2 h.

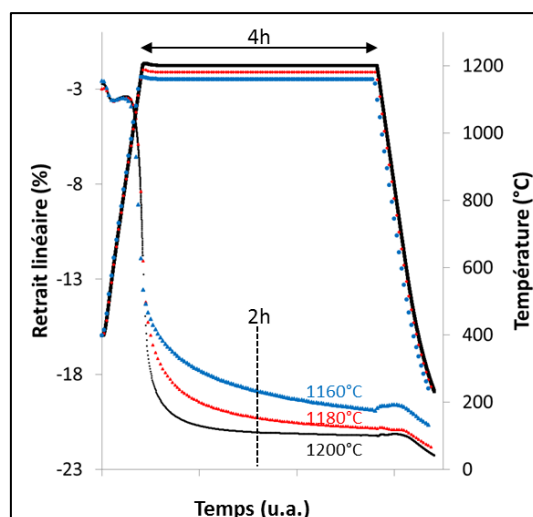


Figure 66 : Courbes de température et de retrait linéaire, en fonction du temps

Température de frittage	Retrait entre 0h00min et 2h00min de palier	Retrait entre 1h55min et 2h05min de palier	Proportion du retrait entre 1h55min et 2h05min par rapport au retrait à 2h00min	Retrait total
1160°C	7,0 %	0,12 %	1,7 %	19,8 %
1180°C	8,3 %	0,08 %	1,0 %	20,8 %
1200°C	9,4 %	0,03 %	0,3 %	21,2 %

Tableau 28 : Variations relatives d'épaisseur, mesurées par dilatométrie horizontale, pour trois températures de frittage

Des échantillons crus, identiques aux échantillons utilisés pour les analyses dilatométriques, subissent des cycles thermiques sous air, avec un palier de frittage de 2 h, ne différant que par la température de frittage, dans un four Super Khantal. Les cycles étudiés sont schématisés en Figure 67. Trois échantillons sont frittés lors de chaque cycle.

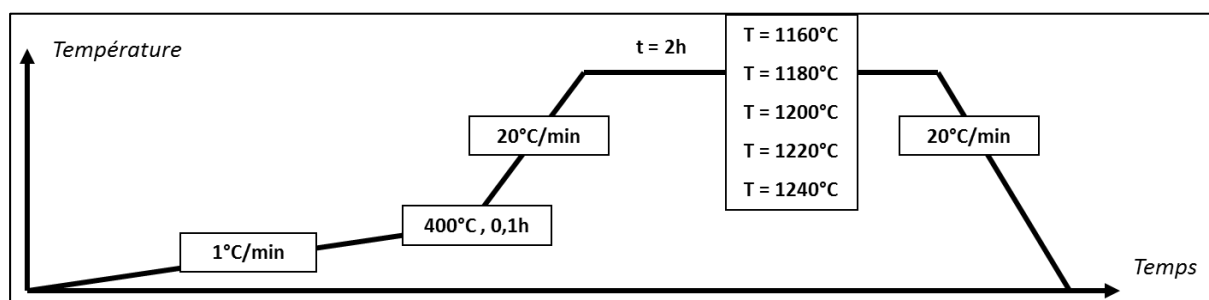


Figure 67 : Cycles de frittage – Variation de la température de frittage

Les diffractogrammes des échantillons frittés pendant 2h à 1160°C, 1180°C, 1200°C, 1220°C et 1240°C, obtenus par DRX, dans les conditions décrites en annexe II.1, sont présentés en Figure 68. La phase secondaire α -TCP est détectée sur les échantillons frittés à 1240°C. De plus, l'intensité relative du pic à 33° (par rapport aux autres pics du même diffractogramme) est beaucoup plus élevée dans le cas de l'échantillon fritté à 1240°C que dans le cas des échantillons frittés à plus basse température (Figure 69). Cette augmentation d'intensité suggère la contribution du pic principal de la phase Ca_2SiO_4 , phase issue de la décomposition thermique de l'hydroxyapatite silicatée. Ces résultats sont en accord avec les travaux de menés par Palard *et al.* [48]. En revanche, seule la phase apatitique est présente sur les diffractogrammes des échantillons frittés à plus basse température. Un léger décalage des pics est cependant observé, sur tous les diffractogrammes, par rapport à la fiche de référence de l'HA, en raison de l'incorporation du silicium dans la maille apatitique. La substitution provoque une hausse du paramètre de maille a et une élévation du volume de la maille, induisant ainsi une légère variation de l'angle diffracté [82].

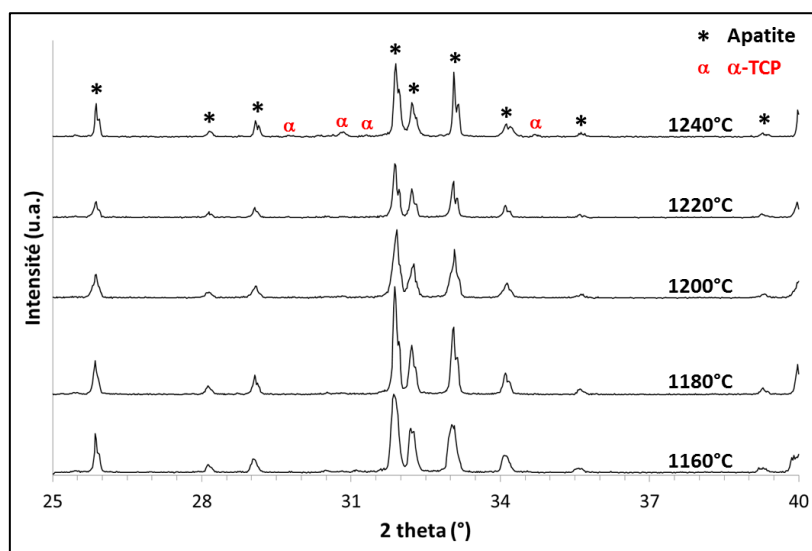


Figure 68 : Diffractogrammes des échantillons frittés respectivement à 1160°C, 1180°C, 1200°C, 1220°C et 1240°C, pendant 2h

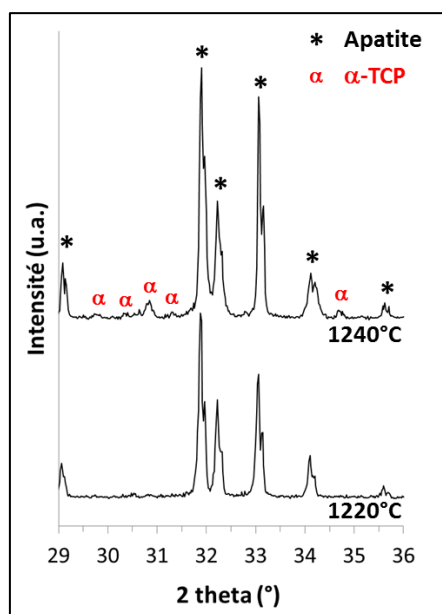


Figure 69 : Diffractogrammes des échantillons frittés respectivement à 1220°C et 1240°C, pendant 2h

L'absence de phase secondaire sur les échantillons frittés à 1160°C, 1180°C, 1200°C, et 1220°C est vérifiée par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier. Les spectres IRTF des poudres issues du broyage au mortier des échantillons frittés, acquis dans les conditions décrites en annexe II.2, sont présentés en Figure 70. Les bandes d'absorption signalées sur les spectres sont explicitées au paragraphe II.2 (p 70) et spécifiées dans le Tableau 11. La présence des phases secondaires sur l'échantillon fritté à 1240°C engendre la présence d'épaulements supplémentaires sur les spectres IRTF. Les résultats obtenus par spectroscopie IRTF sont donc en accord avec ceux obtenus par DRX.

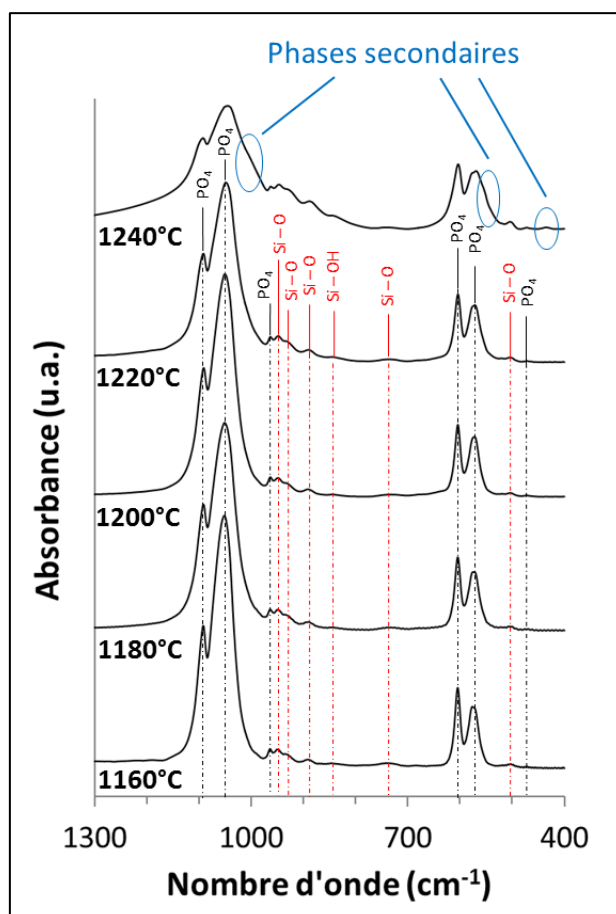


Figure 70 : Spectres IRTF des échantillons frittés respectivement à 1160°C, 1180°C, 1200°C, 1220°C et 1240°C, pendant 2 h

Une température de frittage de 1220°C, pour une durée de palier de 2 h, ne peut donc pas être dépassée, en vue de l'obtention d'échantillons purs, ne contenant aucune phase secondaire.

Le taux de microporosité ouverte des échantillons frittés est mesuré par la méthode d'Archimède, décrite en annexe IV.2, et leur surface spécifique est mesurée par la méthode BET, décrite en annexe III. Les valeurs de taux de microporosité ouverte et de surface spécifique sont reportées en fonction des températures de frittage, en Figure 71.

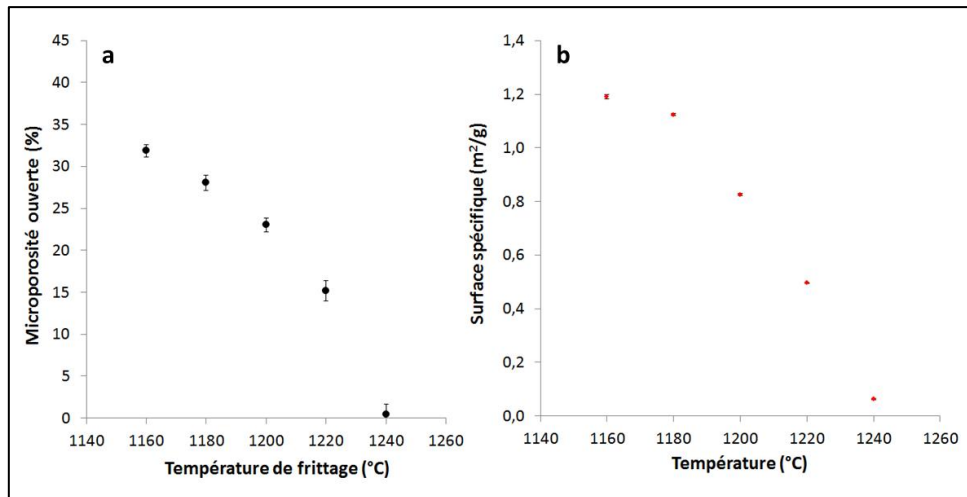


Figure 71 : Taux de microporosité ouverte (mesurés par méthode d'Archimède, moyennés sur 3 échantillons) (a) et surfaces spécifiques (mesurées par méthode BET, moyennées sur 2 échantillons)(b), en fonction des températures de frittage, pour une durée de frittage de 2 h

Pour une température de frittage de 1240°C, le taux de densification atteint 89 % et la microporosité résiduelle est alors totalement fermée. Une microporosité ouverte est conservée pour des températures de frittage strictement inférieures à 1240°C et le taux de microporosité ouverte augmente avec la diminution de la température de frittage (Figure 71-a), jusqu'à environ 32 %. Cette valeur est obtenue pour une température de frittage de 1160°C. Or, après mise en forme par μ SL, la matrice organique des pièces crues, qui se décompose à basse température, représente environ 45 % du volume de la pièce (taux de charge de 55 %vol en poudre céramique). Le taux de microporosité ouverte doit donc pouvoir être augmenté en théorie. Une diminution de la température de frittage n'est cependant pas envisageable car elle engendre un manque de cohésion des grains.

La gamme de taux de microporosité ouverte peut être élargie en faisant varier la durée du palier de frittage. Les analyses dilatométriques présentées en Figure 66 montrent une variation rapide du retrait linéaire sur des temps courts de frittage pour des températures de frittage supérieures ou égales à 1180°C. Ces variations rapides ne permettent pas d'envisager un contrôle de la microporosité à ces températures. En revanche, l'évolution lente du retrait linéaire à 1160°C jusqu'à une durée de frittage de deux heures, montre qu'une diminution de la durée de frittage à cette température doit permettre un élargissement contrôlé de la gamme de taux de microporosité ouverte. La température de frittage est donc fixée à 1160°C, les

cycles thermiques réalisés sous air, dans un four Super Khantal, ne différant que par la durée du palier (Figure 72).

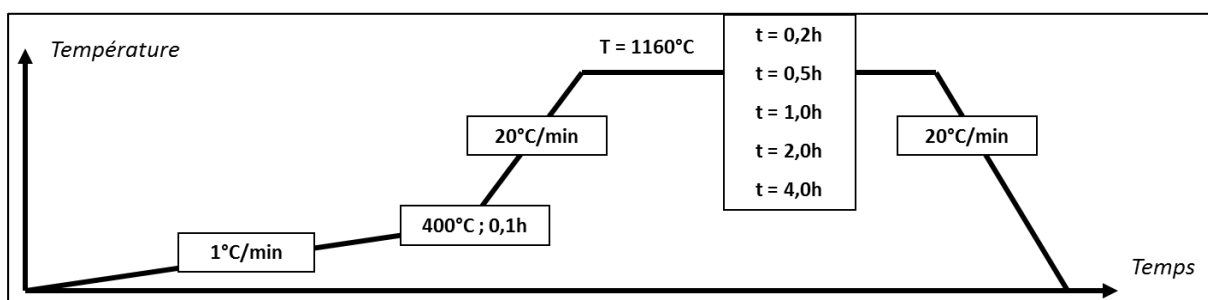


Figure 72 : Cycles de frittage – Variation de la durée de frittage

Trois échantillons sont frittés pour chaque cycle. Les valeurs de taux de microporosité ouverte et de surface spécifique sont reportées en fonction des températures de frittage, en Figure 73.

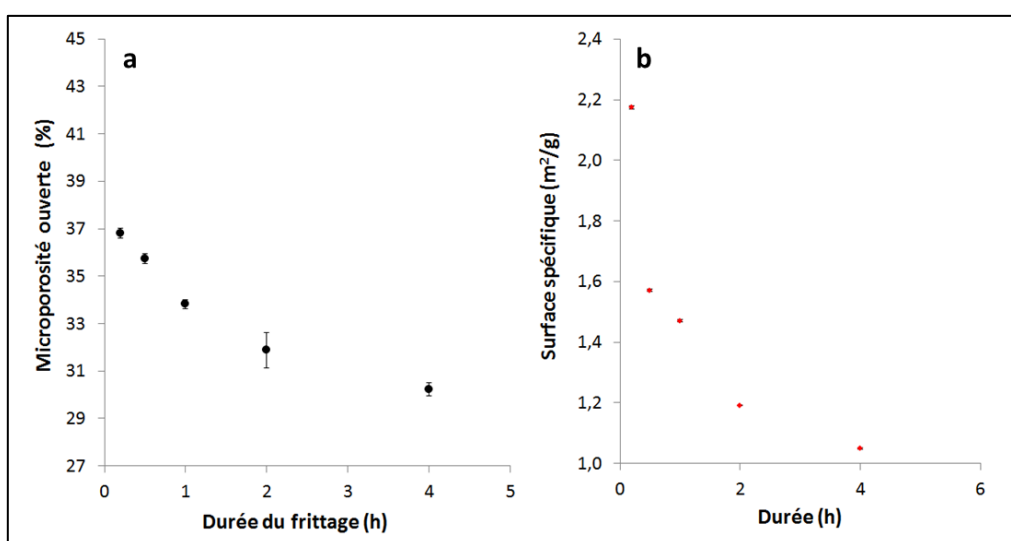


Figure 73 : Taux de microporosité ouverte (mesurés par méthode d'Archimède, moyennés sur 3 échantillons) (a) et surfaces spécifiques (mesurées par méthode BET, moyennées sur 2 échantillons) (b), en fonction de la durée de frittage, pour une température de frittage de 1160°C

La diminution du temps de frittage engendre une augmentation du taux de microporosité ouverte et de la surface spécifique. La gamme de taux de microporosité ouverte

peut être élargie jusqu'à environ 37 %, valeur obtenue pour un frittage à 1160°C pendant 0,2 h. La diminution du temps de palier à 0,2 h permet d'atteindre une valeur de surface spécifique maximale d'environ 2,2 m².g⁻¹.

Sur la Figure 74 sont reportées les valeurs de surface spécifique en fonction du taux de microporosité ouverte. L'évolution est quasiment linéaire pour des taux de microporosité ouverte inférieurs à 35 %. Une augmentation du taux de microporosité ouverte vers des valeurs plus importantes engendre un accroissement rapide de la surface spécifique. En particulier, pour les échantillons frittés à 1160°C pendant 0,2 h, la surface spécifique maximale atteinte est d'environ 2,2 m².g⁻¹. La chute brutale de la surface spécifique avec l'augmentation du temps de palier de 0,2 h à 0,5 h s'explique par la formation des soudures entre les grains, remarquable sur les micrographies MEB (réalisées dans les conditions précisées en annexe VIII) présentées en Figure 75. Ce phénomène correspond au stade primaire du frittage (Figure 63, p 127).

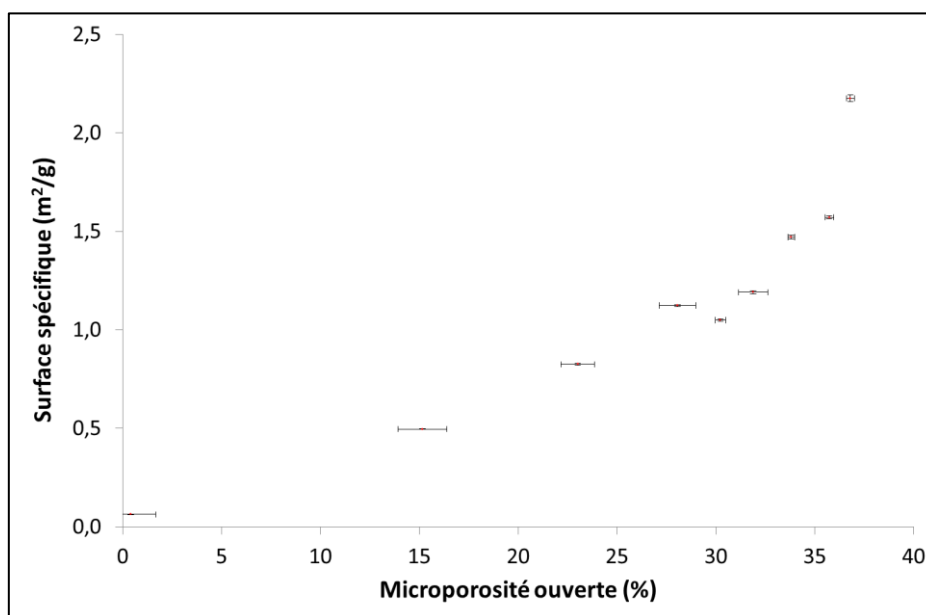


Figure 74 : Valeurs de surface spécifique (mesurées par méthode BET, moyennées sur deux échantillons) en fonction des taux de microporosité ouverte (mesurés par méthode d'Archimède, moyennés sur trois échantillons)

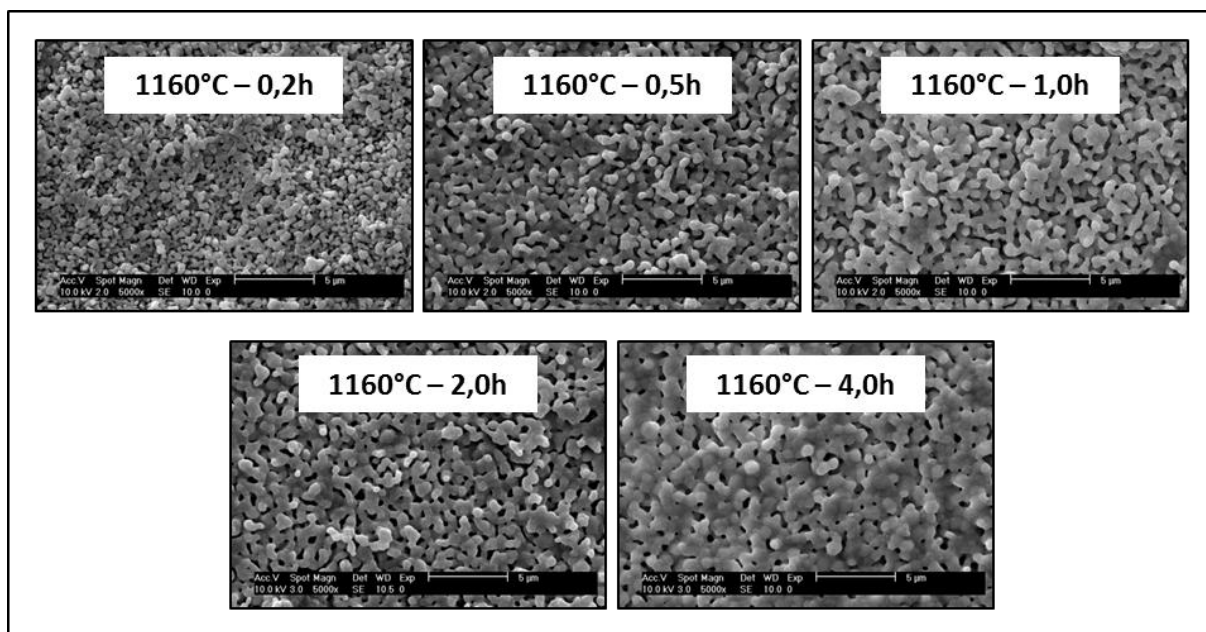


Figure 75 : Micrographies MEB d'échantillons frittés à 1160°C avec différents paliers selon les cycles présentés en Figure 72

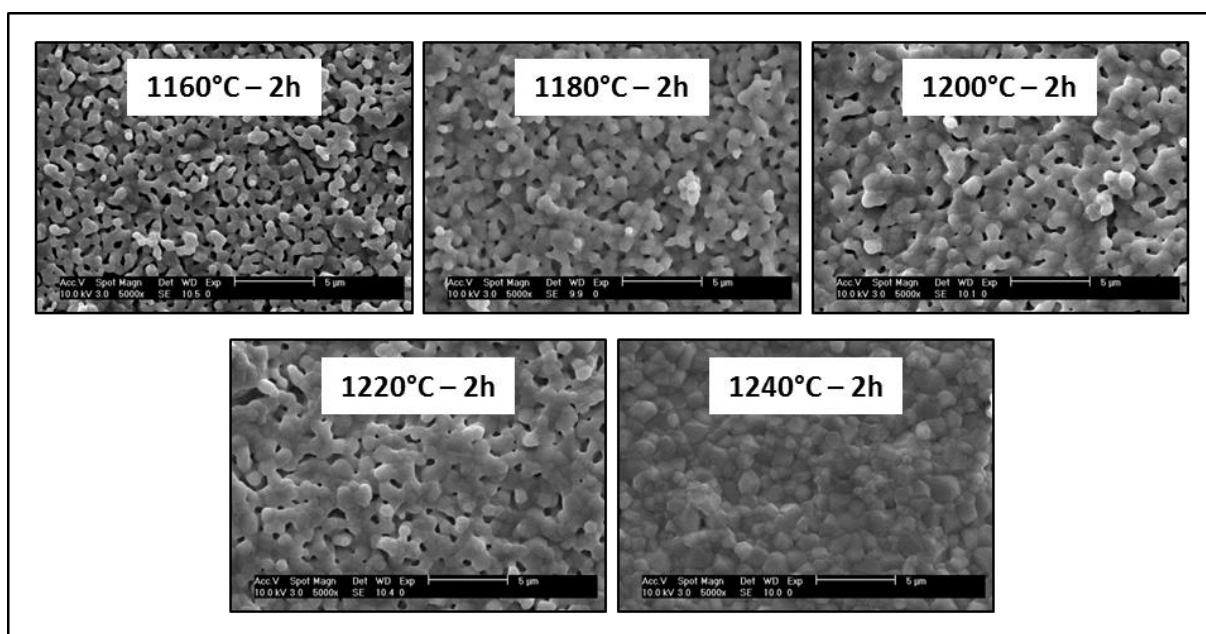


Figure 76 : Micrographies MEB d'échantillons frittés pendant 2h à différentes températures selon les cycles présentés en Figure 67

L'augmentation de la durée de palier à basse température (1160°C) engendre un léger grossissement des grains (Figure 75). De plus, l'apparition notable de soudures entre les

grains dès 0,5 h de palier explique la chute rapide de surface spécifique à 1160°C entre 0,2 et 0,5 h de palier (Figure 73-b). Le phénomène de croissance granulaire apparaît plus important lors d'une augmentation de température, à durée de palier fixée (2 h) (Figure 76).

Les mesures, au pied à coulisse, de largeur et d'épaisseur des pièces, avant et après frittage, permettent l'obtention du retrait horizontal et vertical des échantillons. Les valeurs de retraits, moyennées sur trois pièces pour chaque cycle de frittage, sont présentées en Figure 77. Elles varient dans une gamme de 5 % jusqu'à 20 % en fonction du cycle de frittage. Cette densification est en accord avec les taux de porosité résiduelle mesurés. Dans tous les cas, le retrait vertical est supérieur au retrait horizontal en raison essentiellement de l'orientation préférentielle des particules de céramique engendrée par l'étalement de la suspension par le racleur lors de la mise en forme des pièces. De plus, des forces de frottements entre le support et l'échantillon s'opposent au retrait horizontal lors du frittage. Enfin, le poids propre des pièces pourrait aussi intervenir en faveur du retrait vertical.

Ces résultats permettent le dimensionnement des pièces en cru, connaissant le cycle de frittage sélectionné en fonction des valeurs de taux de microporosité ouverte et/ou de surface spécifique souhaitées.

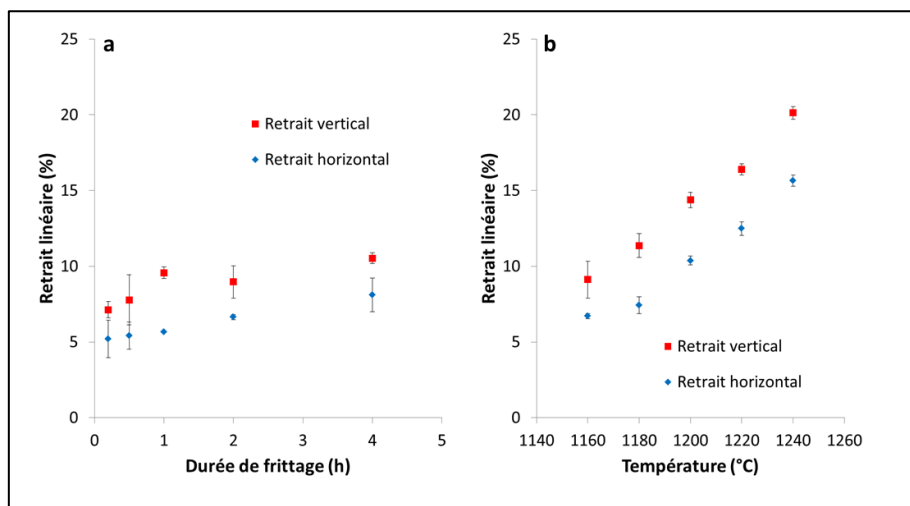


Figure 77 : Evolution du retrait linéaire avec la durée de frittage pour une température fixée à 1160°C (a) et avec la température pour une durée de frittage fixée à 2 h (b) (valeurs moyennes obtenues à partir de trois échantillons pour chaque cycle thermique)

II.6 Conclusion du chapitre II

Des suspensions photopolymérisables de SiHA adaptées au procédé de microstéréolithographie ont été élaborées. Une suspension, permettant un bon compromis entre réactivité, définition, et taux de charge élevés, a été utilisée pour mettre en forme des pièces multicouches. Les paramètres du procédé ont été adaptés à cette suspension et optimisés afin d'obtenir une bonne définition des pièces. Un modèle prédictif permettant le dimensionnement des masques, selon les dimensions de pore souhaitées sur la pièce en cru, a été établi, à partir de l'étude de l'évolution de la surpolymérisation avec les dimensions du masque des pores (Figure 78). Ce modèle a également permis de vérifier la faisabilité de la mise en forme de macropores dans la gamme de taille souhaitée (300-600 μm), pour différentes géométries.

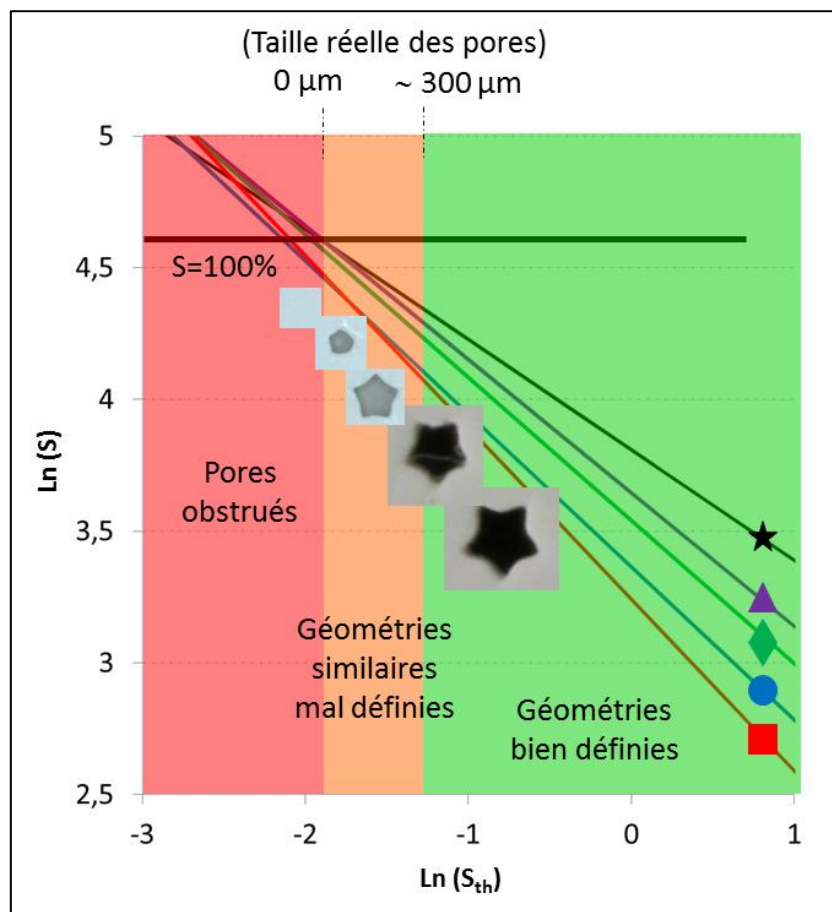


Figure 78 : Evolution de la surpolymérisation S avec la surface théorique S_{th} du pore selon le masque, pour différentes géométries de pore

L'étude du frittage des échantillons mis en forme par microstéréolithographie a permis l'obtention de pièces en SiHA monphasée de microstructures variées. Les gammes de taux de microporosité ouverte et de surface spécifique ainsi obtenues sont présentées en Figure 79.

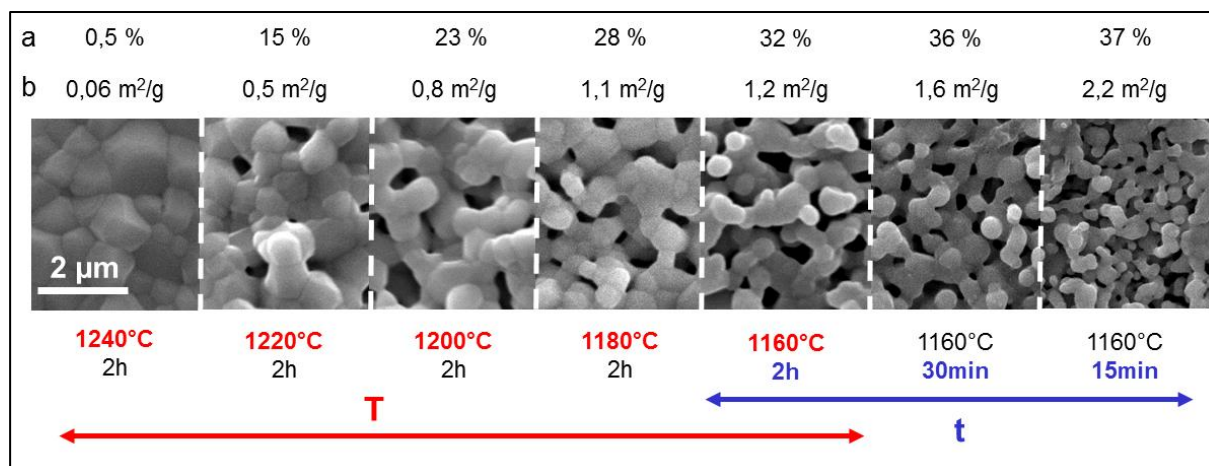


Figure 79 : Evolution du taux de microporosité ouverte (a) et de la surface spécifique (b) des échantillons SiHA mis en forme par μ SL, en fonction des paramètres de frittage

Enfin, une fois le cycle de frittage sélectionné en fonction des valeurs de taux de microporosité ouverte et/ou de surface spécifique souhaitées, la connaissance du retrait linéaire permet le dimensionnement des pièces et des pores en cru, et par calcul celui des masques à partir du modèle prédictif établi.

La Figure 80 présente des photographies de pièces mises en forme par μ SL et frittées avec différents cycles thermiques. Ce type de pièce est utilisé pour une évaluation biologique préliminaire présentée dans le chapitre III.

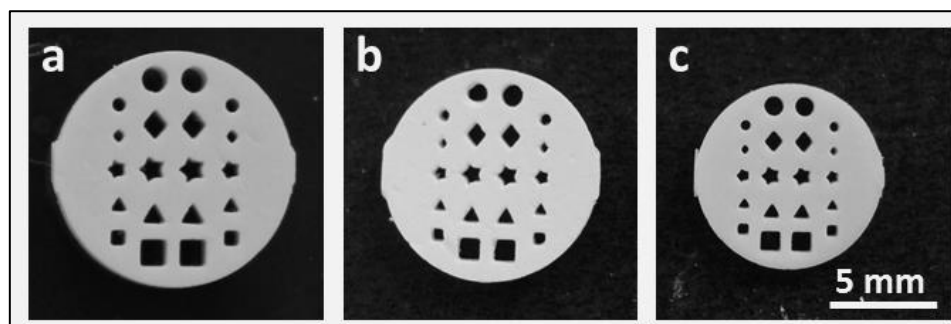


Figure 80 : Photographies de pièces de dix couches mises en forme par μ SL : en cru (a), frittée à 1160°C – 0,2 h (b) et frittée à 1240°C – 2 h (c)

Chapitre III – Evaluation biologique

III.1 Introduction

L'adsorption de matériel endogène à la surface des substituts osseux, lors de leur implantation, est une étape importante dans le processus d'intégration des implants. Le premier objectif de ce chapitre consiste à évaluer les interactions entre une protéine et la surface des matériaux HA et SiHA et de déterminer quel peut être l'éventuel effet de l'adsorption de cette protéine sur sa conformation. Ces travaux sont réalisés sur poudres afin de garantir une grande surface d'interaction entre la protéine et le matériau. Le second objectif est d'évaluer l'effet de l'incorporation du silicium dans la maille apatitique et l'effet de l'adsorption de cette protéine, sur la réponse inflammatoire. Cette étude est réalisée *in vivo*, par implantation sous-cutanée de granules, suite à des études de biocompatibilité menées *in vitro* directement sur pastilles et indirectement, sur lames de verre, à partir d'extraits de granules. Ces travaux ont été effectués en collaboration avec le laboratoire *Brazilian Center for Physics Research* (CBPF, Rio de Janeiro, Brésil) dans le cadre du programme de coopération internationale CoopIntEER (2010-2012) entre le Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, France) et le *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq, Brésil). Ce projet, intitulé « Propriétés physico-chimiques et biocompatibilité d'hydroxyapatites silicatées associées à des peptides » a été mené sous la responsabilité du Docteur A. Rossi (Laboratoire CBPF, CNPq, Brésil) et du Docteur C. Damia (Laboratoire SPCTS, CNRS, France). Les principaux résultats ont fait l'objet d'une publication [249].

Le dernier objectif de ce chapitre est d'évaluer l'effet de la taille et/ou des géométries des macropores sur la prolifération cellulaire et sur la vascularisation des céramiques poreuses en SiHA. Cette étude est réalisée sur des substrats plans comportant des macropores prismatiques et cylindriques verticaux traversant, de différentes sections géométriques, mis en forme par microstéréolithographie et frittés selon les protocoles définis au chapitre II. La prolifération cellulaire est observée *in vitro* et la vascularisation *ex vivo* sur la membrane chorio-allantoïdienne d'embryons de poulets. L'étude *in vitro* est réalisée en collaboration avec le Docteur U. Rüdrieh, dans le cadre du laboratoire d'excellence SigmaLim. L'étude *ex-*

vivo est menée en collaboration avec l'équipe "Homéostasie Cellulaire et Pathologies" (EA 3842, laboratoire d'Immunologie, Centre Hospitalier Universitaire de Limoges) avec le Docteur F. Lalloué et le Docteur A. Magnaudeix.

III.2 Adsorption de protéines à la surface des matériaux

Suite à l'implantation d'un substitut dans l'organisme, l'adsorption de matériel endogène tel que des protéines précède l'adhésion des cellules au matériau. Il est possible de préparer cette interface biologique matériau/cellules en fonctionnalisant la surface du matériau avec des protéines, afin de favoriser les interactions matériau/cellules.

Cependant, l'adsorption d'une protéine à la surface du matériau peut engendrer un changement de conformation de cette dernière. L'objectif de ce paragraphe est d'adsorber une protéine à la surface des matériaux HA et SiHA et d'étudier l'impact de l'adsorption sur la conformation de la protéine.

III.2.1 Choix de la protéine

L'insuline, de formule brute $C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$, est une hormone peptidique sécrétée par les cellules β du pancréas. Elle possède une chaîne A hydrophyle, composée de 21 acides aminés, et une chaîne B hydrophobe, composée de 30 acides aminés. Ces deux chaînes polypeptidiques sont reliées entre elles par 2 ponts disulfures interchaîne et 1 pont disulfure intrachaîne dans la chaîne A (Figure 81-1). Lorsque l'insuline est sous sa forme fonctionnelle, elle est dite « native » et la structure secondaire de la chaîne A est formée de deux hélices- α antiparallèles tandis que celle de la chaîne B est constituée des conformations de type hélice- α , feuillet- β et coude- β [250,251] (Figure 81-2).

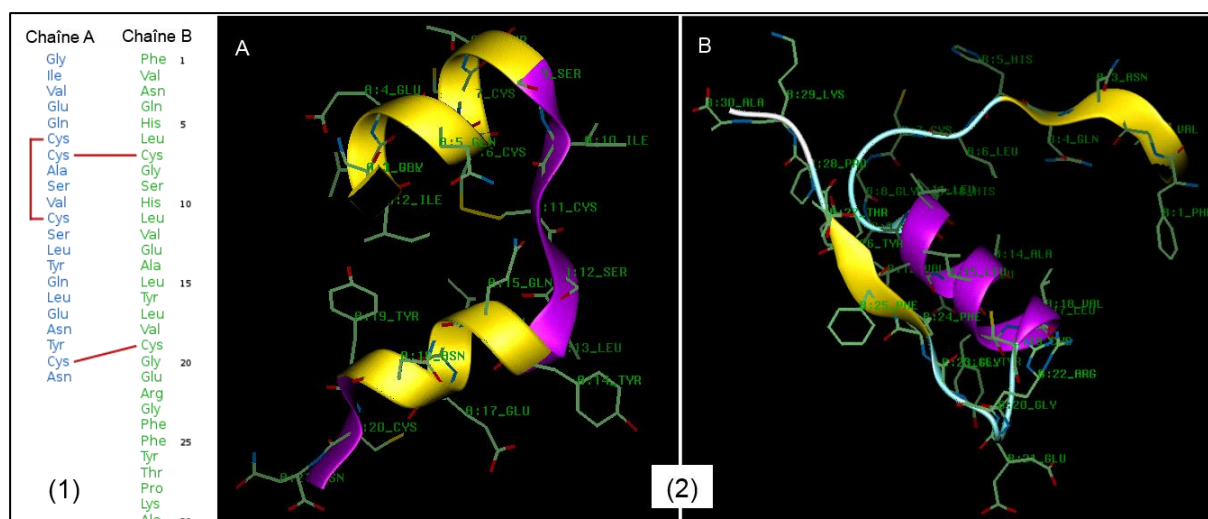


Figure 81 : Structure primaire de l'insuline (1) et structures secondaires (2) de la chaîne A et de la chaîne B

L'insuline et l'IGF (insulin growth factor) participent à de nombreux processus physiologiques chez l'être humain. En particulier, l'influence positive de cette protéine sur la réponse inflammatoire a pu être mise en évidence lors de diverses études [252,253]. D'autres travaux rapportent l'effet de l'insuline sur la stimulation de la prolifération cellulaire et de la différenciation cellulaire vers la lignée ostéoblastique [254–256]. Lors de ce processus, l'insuline intervient en stimulant la production d'ostéocalcine. De récents travaux se focalisent en particulier sur l'importance de l'insuline sur la perte de substance osseuse et sur la fracture osseuse de patients atteints de diabète. Par exemple, l'étude de Gandhi *et al.* [257] a montré qu'une libération locale d'insuline dans le fémur fracturé d'un rat atteint de diabète, induisait l'ostéogénèse. De plus, des particules de phosphate de calcium associées à des polymères ont été testées comme supports pour l'administration d'insuline, sous forme orale ou implantable [258,259].

Ces différents effets de l'insuline sur les processus physiologiques en font une protéine d'intérêt pour l'ingénierie tissulaire. Cependant, les interactions entre cette protéine et les matériaux de type phosphate de calcium sont encore mal connues. Dans ce contexte, le premier objectif de cette étude est d'étudier la faculté d'adsorption de la protéine à la surface de HA et SiHA ainsi que l'effet de cette adsorption sur la conformation de la protéine.

III.2.2 Préparation et caractérisation des substrats

Les poudres d'hydroxyapatite HA et d'hydroxyapatite silicatée SiHA sont synthétisées et caractérisées au laboratoire selon les protocoles décrits au paragraphe II.2. Les poudres sont calcinées à 1000°C pendant 1 h avec une rampe de montée en température de 20°C/min, dans un four Super Kanthal.

L'analyse des phases par diffraction des rayons X, réalisée dans les conditions décrites en annexe II.1, confirme la présence d'une phase cristalline unique de type apatitique indéxée avec la fiche PDF 9-432. Aucune phase cristalline secondaire (TCP ou CaO pour HA, TCP, Ca₂SiO₄ ou Ca₁₀(PO₄)₄(SiO₄)₂ pour SiHA) n'est détectée sur ces diffractogrammes. Les spectres IRTF des deux poudres, similaires aux spectres des poudres calcinées à 1000°C pendant 15 h, présentés au paragraphe II.2 (Figure 18 et Figure 19, p 75), confirment la composition et la pureté de ces poudres.

Les valeurs de surface spécifique des poudres calcinées puis tamisées à 50 µm, évaluées par BET 8 points (Annexe III), sont de 7,67 ± 0,04 m²/g et 14,78 ± 0,08 m²/g pour HA et SiHA respectivement. Une valeur moyenne du diamètre des grains φ, de géométrie supposée sphérique, est calculée selon l'Équation 15, à partir des valeurs de surface spécifique SSA citées précédemment et des masses volumiques théoriques ρ. La valeur de la masse volumique d'HA est prise égale à 3,154 g/cm³ selon la fiche PDF n° 9-432. Celle de SiHA est prise égale à 3,119 g/cm³, valeur déterminée par affinement des paramètres de maille [82]. Les valeurs de tailles de grains calculées sont d'environ 0,25 µm pour HA et 0,13 µm pour SiHA. Les observations MEB, réalisées dans les conditions décrites en annexe VIII, permettent de confirmer l'ordre de grandeur des grains des poudres d'HA et SiHA (Figure 82).

$$\varphi = \frac{6}{\text{SSA} \times \rho}$$

Équation 15 : Calcul du diamètre moyen des grains φ des poudres calcinées, en µm (SSA : surface spécifique en m²/g mesurée par BET 8 points ; ρ : masse volumique théorique en g/cm³)

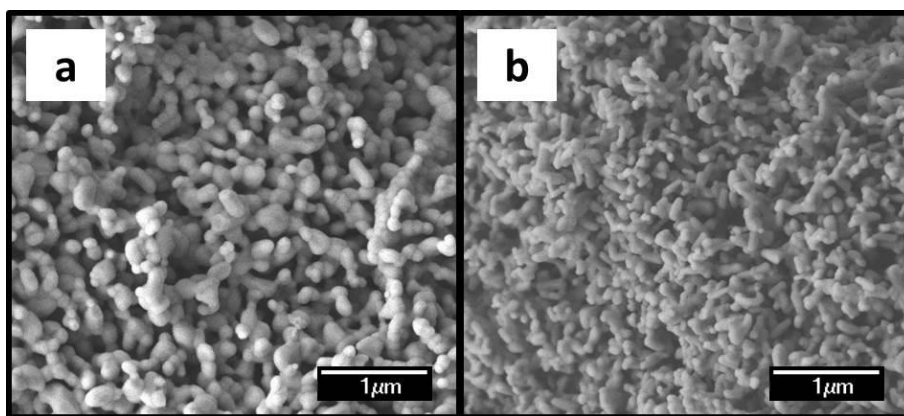


Figure 82 : Micrographies MEB des poudres HA (a) et SiHA (b), calcinées à 1000°C pendant 1 h

Le potentiel zeta ζ des surfaces d'HA et SiHA est mesuré avec un Zetasizer Malvern nano ZS, sur les poudres calcinées mises en suspensions dans une solution de tampon phosphate à 0,05 M, à pH 7,4 et à 25°C. Les valeurs de potentiel zeta ζ sont calculées en moyennant les résultats obtenus sur 8 séries de 5 mesures. Les résultats sont présentés en Figure 83. Les surfaces des deux matériaux présentent des charges globales moyennes négatives similaires (-28 ± 2 mV pour HA et -31 ± 2 mV pour SiHA). L'incorporation de 0,4 mole de SiO_4 dans la structure apatitique n'affecte donc pas, de façon significative, la charge globale de surface du matériau. L'affinité de l'insuline pour ces surfaces n'est donc pas susceptible d'être influencée par un effet de charge global. Les interactions entre la protéine et ces surfaces peuvent cependant être affectées par des modifications de charges locales dues à la présence des groupements SiO_4 .

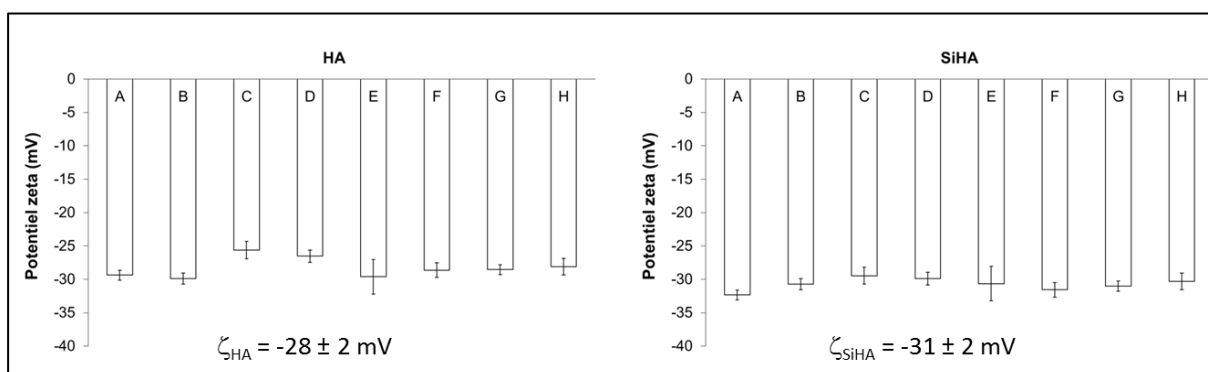


Figure 83 : Valeurs de potentiel zeta obtenues sur 8 séries (notées A à H) de 5 mesures, sur la surface de poudres d'HA et SiHA calcinées à 1000°C pendant 1 h

III.2.3 Adsorption de protéines

III.2.3.1 Isothermes d'adsorption

a. Préparation du tampon phosphate

La solution tampon est préparée par dissolution de 0,27 g de KH_2PO_4 (Merck) et 1,84 g de K_2HPO_4 (Merck) dans 800 mL d'eau distillée. Après homogénéisation, le pH de la solution est ajusté à 7,4 à l'aide de solutions de HCl à 0,01 M et NaOH à 0,02 M. La solution obtenue est transvasée dans une fiole jaugée de 1000 mL, qui est complétée jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée. La solution de tampon phosphate obtenue (à 0,01 M et pH 7,4) est stockée au réfrigérateur.

b. Mise en solution de l'insuline

Une masse de 0,1250 g d'insuline pulvérulente (Sigma, 91077C) est pesée à l'aide d'une balance Denver Instrument Si-234 de précision 10^{-4} g, puis dissoute progressivement dans 10 mL de HCl à 0,01 M. Après dissolution totale de l'insuline dans l'acide, le pH de la solution est mesuré (environ 2,5) et ajusté à 5,0 par ajouts de NaOH à 0,1 M puis élevé progressivement par ajouts goutte à goutte de NaOH à 0,02 M. La solution se trouble alors à l'approche du point isoélectrique de l'insuline (à pH 5,3). L'aspect trouble voire blanc et laiteux de la solution disparaît progressivement avec l'élévation du pH jusqu'à obtention d'une solution translucide à pH 7,0. Les ajouts de NaOH à 0,02 M sont prolongés jusqu'à obtention d'un pH égal à 7,4. La solution obtenue d'environ 20 mL est transvasée dans une fiole jaugée de 50 mL, qui est complétée jusqu'au trait de jauge par la solution de tampon phosphate à pH = 7,4. La solution mère d'insuline à 2,5 mg/mL est placée au réfrigérateur durant une nuit. Dix solutions filles d'insuline sont préparées par dilution de la solution mère à 2,5 mg/mL avec la solution de tampon phosphate à 0,01 M et pH 7,4 et stockées au réfrigérateur. Au total, 12 concentrations sont étudiées, la solution de tampon phosphate constituant la solution à 0 mg/mL d'insuline.

c. Imprégnation

Les poudres de HA et SiHA calcinées à 1000°C pendant 1 h sont tamisées à 50 μm afin d'éliminer d'éventuels agrégats formés pendant la calcination. Des masses de 10 mg de

poudres sont pesées à l'aide d'une balance Denver Instrument Si-234 de précision 10^{-4} g dans des épandorfs de contenance maximale 2 mL.

Un volume de 1,6 mL de solution d'insuline est versé dans les microtubes contenant les poudres. Pour chaque concentration, 3 microtubes identiques sont préparés, soit au total 36 microtubes par composition (HA et SiHA). Enfin, pour chaque concentration, 1,6 mL de solution est versé dans un microtube ne contenant aucune poudre. Suite à l'imprégnation, les épandorfs sont placés, durant 24 h, sur une plaque d'agitation Heidolph Unimax 1010 réglée à 90 tr/min, au sein d'un incubateur Heidolph Inkubator 1000, réglé à 37°C.

Les microtubes de 2 mL sont ensuite centrifugés à 13000 tr/min, pendant 10 min, à 10°C. Un volume de 1,3 mL de surnageant est prélevé et introduit dans des microtubes de 1,5 mL qui sont, à leur tour, centrifugés à 13000 tr/min, pendant 10 min, à 10°C. Enfin, un volume de 1,15 mL de surnageant est prélevé et introduit dans des microtubes de 1,5 mL également centrifugés à 13000 tr/min, pendant 10 min, à 10°C. Les microtubes sont stockés au réfrigérateur avant l'analyse spectroscopique.

d. Analyses spectroscopiques

Les mesures sont effectuées avec un spectromètre UV-Vis (Varian, Cary 5000).

Dans un premier temps, une ligne de base est effectuée avec deux cuves de mesure en quartz vides (Sodiopro 114-QS) de largeur 10 mm, sur un intervalle de longueur d'onde de 200 – 800 nm. Le domaine d'absorbance du tampon pH est vérifié sur cette plage de longueur d'onde, avec une cuve vide et une cuve contenant 1 mL de solution tampon. Enfin, une acquisition similaire avec une cuve vide et une cuve contenant 1 mL de solution d'insuline permet de vérifier la longueur d'onde d'absorbance maximale de l'insuline. Les résultats obtenus, reportés en Figure 84, témoignent d'une absorbance maximale de l'insuline à 278 nm et d'une absence d'absorbance de la solution tampon à cette longueur d'onde. Les mesures sont donc effectuées à 278 nm.

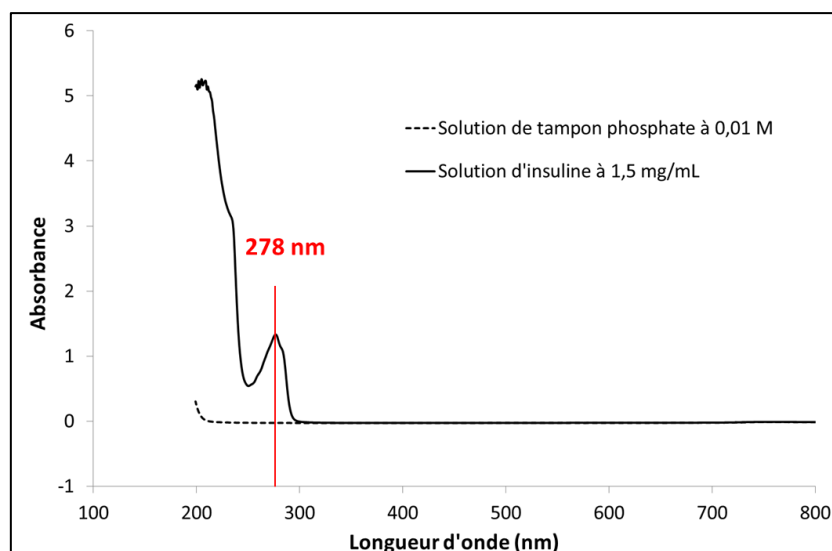


Figure 84 : Absorbance des solutions de tampons phosphate et d'insuline sur l'intervalle 200-800 nm

La droite d'étalonnage, présentée en Figure 85, est obtenue par mesure de l'absorbance des 12 solutions étalons ayant subi les mêmes traitements que les échantillons (agitation à 90 tr/min, à 37°C, pendant 24 h et 3 cycles de centrifugation à 13000 tr/min, à 10°C, pendant 10 minutes).

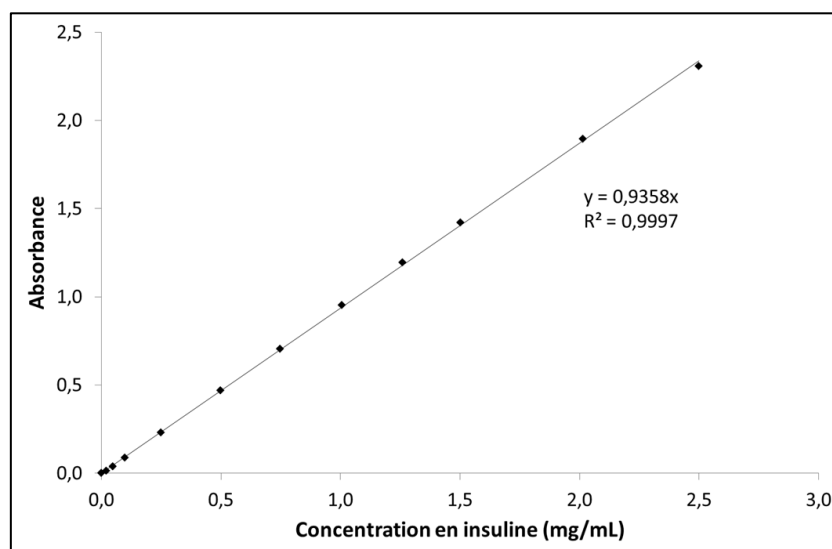


Figure 85 : Droite d'étalonnage de l'absorbance établie avec les solutions d'insuline

Les mesures sont effectuées avec une cuve vide et une cuve contenant 1mL de surnageant à analyser. Les valeurs d'absorbance des solutions d'imprégnation sont soustraites à celles des surnageants. La différence d'absorbance est convertie en concentration grâce à la droite d'étalonnage. La masse d'insuline adsorbée est déduite de cette concentration, connaissant le volume de solution initial. La masse d'insuline adsorbée est ramenée à un gramme de poudre, connaissant la masse de poudre présente dans les microtubes. Enfin, la masse d'insuline adsorbée est ramenée à une unité de surface connaissant les valeurs de surface spécifique des poudres calcinées et tamisées à 50 μm (mesurées par BET 8 points).

e. Résultats

Les isothermes d'adsorption de l'insuline sur les poudres d'HA et SiHA calcinées à 1000°C sont présentées en Figure 86.

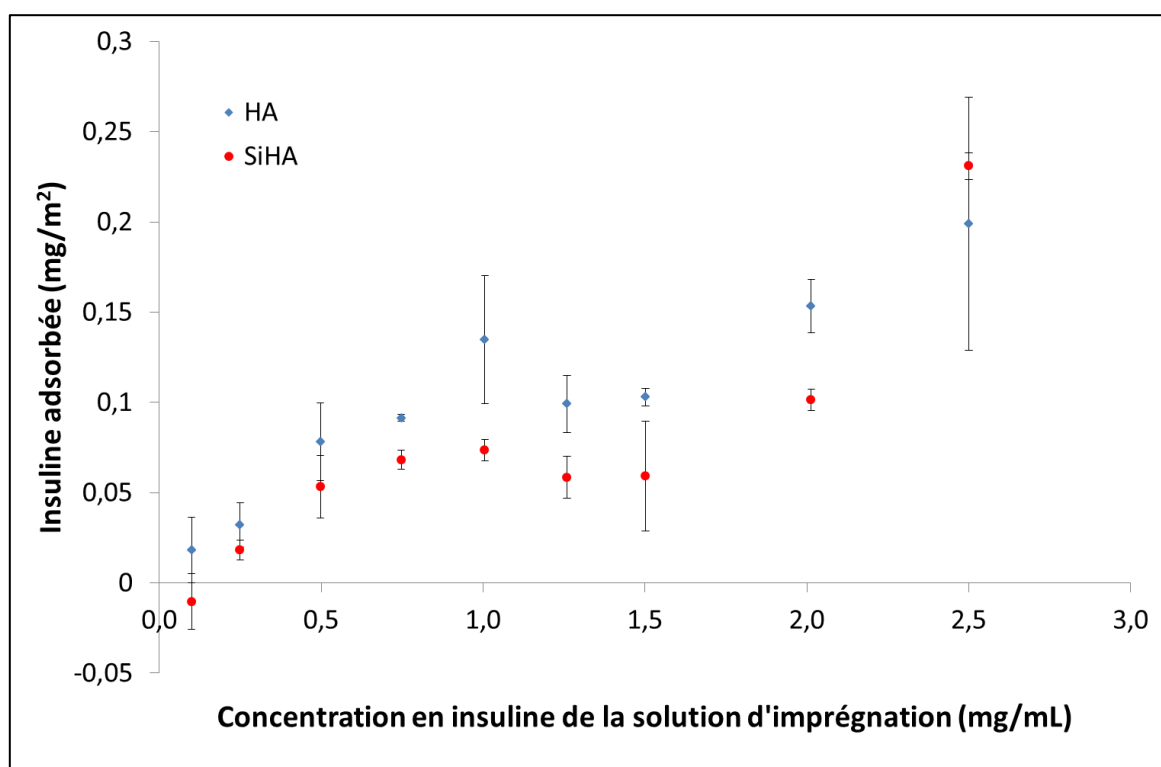


Figure 86 : Isothermes d'adsorption de l'insuline à la surface des poudres HA et SiHA calcinées à 1000°C

Quelle que soit la concentration de la solution d'imprégnation, la quantité d'insuline adsorbée à la surface de SiHA est moins élevée que celle adsorbée à la surface d'HA. Pour les deux matériaux, les isothermes présentent le même profil. Dans un premier temps, la quantité d'insuline adsorbée croît avec la concentration de la solution d'imprégnation jusqu'à environ 1,0 mg/mL. Cette première étape peut correspondre à la formation d'une couche de protéines à la surface du matériau. Une inflexion est ensuite observée pour des concentrations de solution d'imprégnation comprises entre 1,0 et 2,0 mg/mL environ. Ce phénomène suggère une saturation de la surface du matériau par la première couche formée. Enfin une élévation de la concentration de la solution d'imprégnation à partir de 2,0 mg/mL engendre une élévation rapide de la quantité d'insuline adsorbée. Des concentrations de solution d'imprégnation supérieures à 2,0 mg/mL sont donc susceptibles d'entraîner la formation de plusieurs couches d'insuline à la surface du matériau.

III.2.3.2 Conformation de l'insuline adsorbée

Dans ce paragraphe, la nomenclature suivante est adoptée pour les quatre groupes étudiés :

- HA : substrats constitués d'HA
- HAins : substrats constitués d'HA et imprégnés d'insuline
- SiHA : substrats constitués de SiHA
- SiHAins : substrats constitués de SiHA et imprégnés d'insuline

a. Techniques de caractérisation

Suite à l'imprégnation des poudres HA et SiHA avec une solution d'insuline à 2,0 mg/mL et aux cycles de centrifugation détaillés au paragraphe III.2.3.1c, les poudres sont séchées à 37°C pendant 48 h et analysées par IRTF avec un spectromètre Shimadzu IRPrestige-21/AIM-880. Afin d'accroître l'intensité des bandes correspondant aux amides I et II, la concentration de poudre au sein des pastilles de KBr est élevée à 10 % en masse.

Des analyses de dichroïsme circulaire (circular dichroism - CD) sont également effectuées sur les poudres des groupes HAins et SiHAins (taux d'imprégnation de 0,2 mg/mL et 2,0 mg/mL), à l'aide d'un spectrophotomètre Jasco J-810 de largeur spectrale 140 - 260 nm.

Le dichroïsme circulaire est une méthode courante d'analyse, en solution, de la structure secondaire des protéines, de leur repliement et des liaisons existant au sein de celles-ci [251,260,261]. Dans la région spectrale de l'UV lointain, chaque structure secondaire donne lieu à un signal de profil et d'amplitude spécifiques. Dans des conditions expérimentales adéquates, un signal CD peut être obtenu à partir d'une protéine liée à la surface d'une particule [262,263].

Le faisceau UV étant partiellement dévié par les particules solides en suspension, une faible concentration en particules et une petite taille de particules sont deux conditions favorables à l'obtention d'un signal CD exploitable. Afin d'optimiser le signal reçu, les mesures sont effectuées avec une fine fraction de particules. Immédiatement après l'adsorption de l'insuline, la poudre est rincée trois fois à l'eau distillée et centrifugée pour éliminer la portion de protéine faiblement liée. 10 mg de poudre sont redispersés dans 100 μ l d'eau distillée. L'acquisition des spectres CD est effectuée suite à la précipitation des particules les plus grossières dans le fond de la cellule de mesure.

b. Résultats et discussion

Les spectres IRTF relatifs aux groupes HA, HAins, SiHA et SiHAins (Figure 87-a) présentent les modes de vibration des groupements phosphate (ν_1 , ν_2 , ν_3 , ν_4) et des groupements hydroxyde (ν_S , ν_L) typiques de la structure apatitique. Concernant les groupes SiHA et SiHAins, les bandes supplémentaires détectées à 528, 700 et 895 cm^{-1} sont attribuées aux tétraèdres SiO_4 présents dans la structure apatitique.

Dans le cas des poudres ayant subi une adsorption d'insuline, de nouvelles bandes sont détectées (Figure 87-a). Ces bandes correspondent aux fonctions amide responsables des liaisons peptidiques entre les amino-acides constitutifs des protéines. Selon la littérature [264,265], la bande de l'amide A, détectée autour de 3300 cm^{-1} , est due aux vibrations d'élongation de la liaison N-H. La bande de l'amide I, située vers 1700-1600 cm^{-1} , est principalement due aux vibrations d'élongation de la double liaison C=O. Enfin, la bande de l'amide II, située vers 1575-1480 cm^{-1} , est due aux vibrations de déformation angulaire des liaisons N-H et aux vibrations d'élongation des liaisons C-N. La présence d'insuline à la surface des matériaux, après adsorption, est donc confirmée par les analyses IRTF.

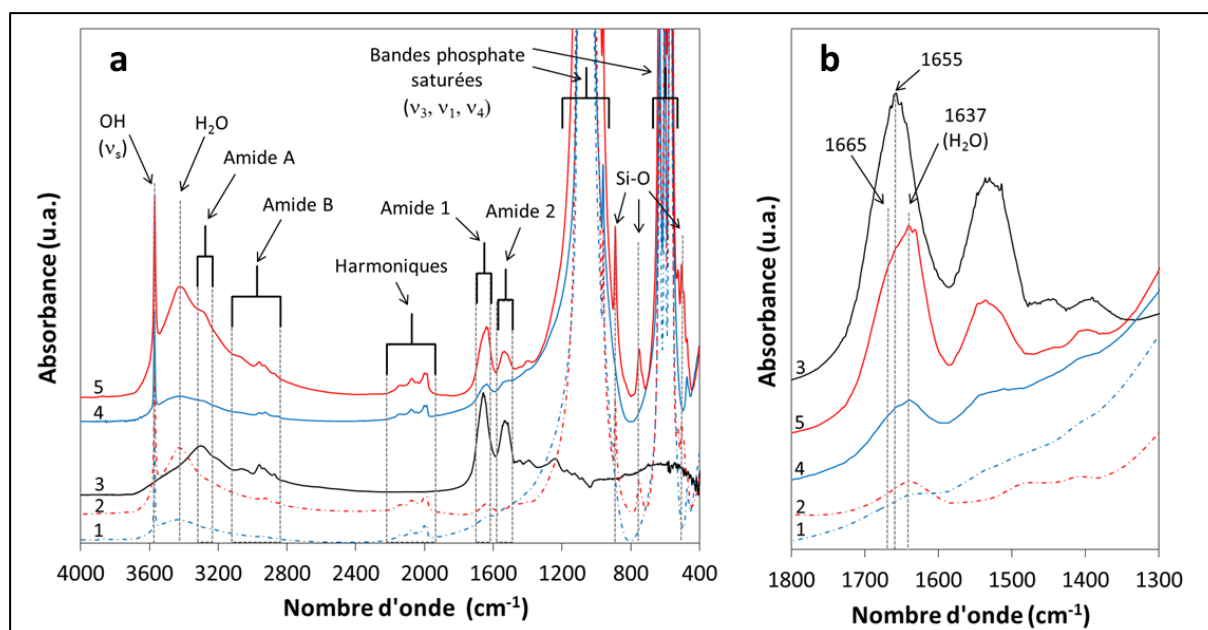


Figure 87 : Spectres IRTF de HA (ligne pointillée 1), de SiHA (ligne pointillée 2), de l'insuline (ligne pleine 3), de HAINS (ligne pleine 4) et de SiHAINS (ligne pleine 5). (a) Spectre large sur 4000 – 400 cm⁻¹, (b) Zoom sur la région spectrale de l'amide I.

La Figure 87-b présente un agrandissement de la zone spectrale 1800-1300 cm⁻¹. Dans cette région, les bandes de vibration des groupements phosphate et hydroxyde de l'apatite ne se superposent pas à celles de la protéine. En particulier, la région de l'amide I (1700-1600 cm⁻¹) constitue la zone spectrale la plus sensible aux composants de la structure secondaire des protéines. Une analyse approfondie de cette zone spectrale peut donc permettre la détection des modifications de structure secondaire [265].

L'insuline native (Figure 81, p 145), c'est-à-dire sous sa forme fonctionnelle, possède une chaîne A hydrophile et une chaîne B hydrophobe. La structure secondaire de la chaîne A est formée de deux hélices-α antiparallèles et celle de la chaîne B est constituée des conformations de type hélice-α, feuillet-β et coude-β [250,251]. Dans la région spectrale de l'amide I (1700-1600 cm⁻¹), le spectre de l'insuline native (Figure 87-b) présente une bande à 1655 cm⁻¹, caractéristique de la contribution de l'hélice-α [264], mais le spectre de l'insuline adsorbée sur les poudres montre un épaulement supplémentaire à 1665 cm⁻¹ attribué au coude-β [264]. Cette modification peut être due à l'augmentation de la teneur en feuillet-β dans la structure secondaire de l'insuline [266]. Par conséquent, la modification des bandes de vibration de l'amide I peut suggérer un changement de la structure secondaire de la protéine lorsque celle-ci est adsorbée à la surface du matériau. Mais l'altération de la structure de la

protéine peut être due également à des facteurs expérimentaux [267], tels que la pression appliquée lors de la mise en forme de la pastille de KBr ou encore la dissolution partielle du KBr en présence d'humidité résiduelle. Cette dissolution conduit au relargage d'anions bromure qui sont des agents chaotropiques, c'est-à-dire des agents susceptibles de détruire la structure spatiale de la protéine en interférant avec les interactions intramoléculaires faibles. Par conséquent, l'analyse par IRTF ne permet pas à elle seule de conclure sans ambiguïté sur la modification de structure secondaire de l'insuline adsorbée.

Le spectre CD de l'insuline native présente le profil typique d'une structure en hélice- α (Figure 88-a) avec une ellipticité positive intense à 195 nm et une ellipticité négative intense à 209 et 222 nm, ce qui est en accord avec la littérature [261,266].

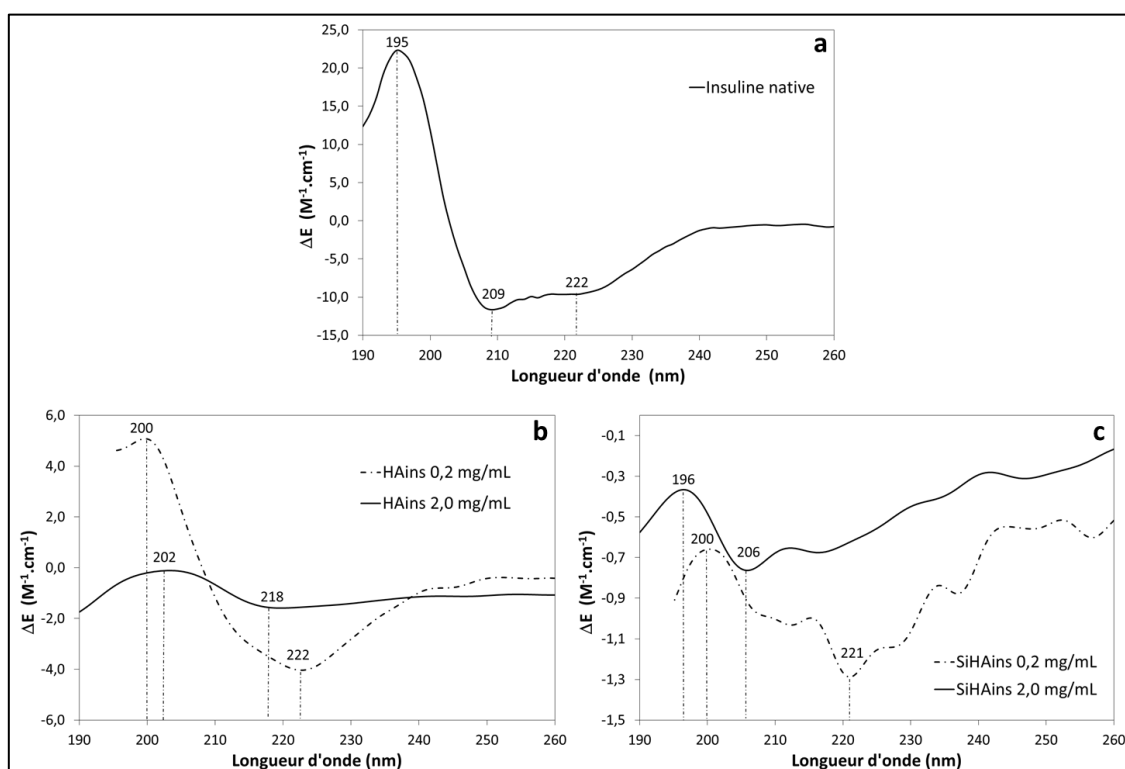


Figure 88 : Spectres CD de (a) l'insuline native, (b) l'insuline adsorbée sur la poudre d'HA : HAins 0,2 mg/mL et HAins 2,0 mg/mL, (c) l'insuline adsorbée sur la poudre de SiHA : SiHAins 0,2 mg/mL et SiHAins 2,0 mg/mL

Les spectres CD obtenus à partir des suspensions de poudres d'HA et SiHA imprégnées d'insuline (Figure 88-b et Figure 88-c) révèlent des intensités d'ellipticité relativement faibles par rapport au spectre de la solution contenant la protéine sous sa forme native (Figure 88-a). Le faible signal obtenu ne permet pas de quantifier avec précision la

contribution de chaque structure secondaire par décomposition du spectre. Cependant, la modification du profil du signal CD, suite à l'adsorption de la protéine à la surface du matériau, suggère des modifications pouvant se produire dans la structure secondaire de l'insuline. Lorsque la protéine est adsorbée à la surface d'HA (HAins), le profil du spectre CD est modifié (Figure 88-b). Avec une faible concentration d'insuline pour l'imprégnation ($0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$), le profil du spectre HAins suggère une contribution de feuillets- β mise en évidence par le déplacement du maximum global positif d'ellipticité de 195 nm à 200 nm et une quasi extinction du minimum d'ellipticité à 209 nm, par rapport au spectre de l'insuline native (Figure 88-a). Dans le cas d'une concentration d'imprégnation plus élevée ($2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$), la contribution des feuillets- β est plus marquée, avec en particulier une amplitude d'ellipticité très faible. De plus, par rapport au spectre de l'insuline native (Figure 88-a), un déplacement du maximum global positif d'ellipticité de 195 nm à 202 nm et un déplacement de minimum local de 222 nm à 218 nm sont observés (Figure 88-b). Enfin, une extinction totale du minimum global à 209 nm, présent sur le spectre de l'insuline native, est observée sur le spectre d'HAins ($2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$). Les spectres de SiHAins sont plus bruités (Figure 88-c), mais la contribution des feuillets- β est également suggérée, notamment avec un déplacement du maximum global positif d'ellipticité de 195 nm à 200 nm, dans le cas d'une concentration d'imprégnation faible ($0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$).

Les résultats IRTF et CD sont en accord. L'adsorption de l'insuline à la surface des matériaux tend à modifier la structure secondaire de la protéine, depuis une forme constituée majoritairement d'hélices- α vers une forme composée de feuillets- β . La modification de la structure secondaire de la protéine due au processus d'adsorption à la surface des particules est rapportée par plusieurs auteurs, sur des poudres de titanes ou de silice [262,263,268]. Une telle modification de la conformation de la protéine peut être associée au processus de dénaturation ou à un repliement différent de la protéine par rapport à son état natif. La dénaturation correspond à un déploiement partiel ou total de la protéine, entraînant généralement une perte de l'activité de la protéine. Au contraire, le repliement de la protéine correspond à sa conformation fonctionnelle. Mais, dans certains cas, un mauvais repliement de la protéine peut conduire à des troubles de son activité biologique. Néanmoins, une réversibilité partielle ou totale de la conformation des protéines a pu être mise en évidence lors de plusieurs travaux, par analyses CD, suite à la désorption de protéines, avec de l'albumine sur des substrats de silice [269] ou d'hydroxyapatite [270] et avec de l'insuline sur du phosphate tricalcique [261]. Sur la base de ces travaux, les modifications observées lors de

la présente étude peuvent également être supposées comme partiellement ou totalement réversibles.

III.3 Etude de biocompatibilité des substrats

La totalité des essais *in vitro* est menée avec des cellules pré-ostéoblastes MC3T3 (ATCC 7594). Il s'agit de cellules capables de se différencier en ostéoblastes, elles-même capables de sécréter la matrice ostéoïde qui se minéralise pour former la substance osseuse.

Une partie des analyses est réalisée par contact indirect, c'est-à-dire par extraction, suivant la norme ISO 10993-5:2009⁹. Pour cette partie, les échantillons utilisés sont des granules denses. L'autre partie des analyses est réalisée par contact direct sur des pastilles denses.

Les quatre groupes suivant sont étudiés :

- HA : substrats constitués d'HA
- HAins : substrats constitués d'HA et imprégnés d'insuline
- SiHA : substrats constitués de SiHA
- SiHAins : substrats constitués de SiHA et imprégnés d'insuline

Les imprégnations d'insuline sont réalisées avec des solutions d'insuline à 20 µg/mL, avec un tampon phosphate à 0,01 M, à 37°C et pH 7,4, pendant 24 h. La stérilisation des substrats est effectuée par irradiation gamma, pendant 12 h, avec une source cobalt 60, 15 KGy, 19,72 Gy/min.

⁹ ISO 10993-5:2009 : Evaluation biologique des dispositifs médicaux – Partie 5 : Essais concernant la cytotoxicité *in vitro*

III.3.1 Matériels et méthodes

III.3.1.1 Préparation et caractérisation des substrats

a. Mise en forme des granules

Des suspensions aqueuses d'HA et SiHA sont préparées à partir de poudres brutes synthétisées et caractérisées dans les conditions décrites au paragraphe II.2. Une solution de polyéthylène glycole (PEG) est préalablement préparée par dissolution d'une masse de 1,00 g dans 50 mL d'eau distillée. Après dissolution totale du PEG, 1,00 g de polyméthacrylate d'ammonium (Darvan C) est ajouté à la solution aqueuse. La solution est ensuite versée dans une fiole jaugée de 150 mL, qui est complétée au trait de jauge par de l'eau distillée. Enfin, 60,00 g de poudre brute HA ou SiHA sont incorporés progressivement dans la solution aqueuse, sous agitation magnétique. Les suspensions d'HA et SiHA ainsi obtenues sont maintenues sous agitation magnétique pendant une nuit. Les suspensions sont ensuite placées dans un cristallisateur, à l'étuve à 100°C, pendant 45 min, afin de permettre une évaporation partielle de l'eau conduisant à l'obtention d'une pâte humide. Les granules sont obtenues par extrusion des pâtes d'HA et SiHA à travers un tamis de 600 µm. Les granules bruts ainsi mis en forme sont tamisés à 400 µm. Les granules de taille inférieure à 400 µm sont éliminés et les granules de taille supérieure à 400 µm sont frittés à 1200°C pendant 1 h, avec une vitesse de montée en température de 20°C/min. Les granules frittés sont tamisés à 600 µm et 355 µm. Seuls les granules de taille comprise entre 355 et 600 µm sont retenus pour les études *in vitro* et *in vivo*.

b. Mise en forme des pastilles

Une partie des poudres brutes d'HA et de SiHA est précalcinée, dans un four Super Kanthal, à 650°C-30min et 700°C-2h respectivement, avec une rampe de 20°C/min. Ce traitement thermique permet l'obtention de surfaces spécifiques similaires pour les poudres des deux compositions. Les valeurs de surface spécifique mesurées par BET 8 points sont de $31,1 \pm 0,2$ m²/g pour HA et $31,6 \pm 0,23$ m²/g pour SiHA. Les pastilles sont mises en forme par pressage uniaxial de 300 mg de poudre précalcinée, dans une matrice en acier de diamètre 10 mm, avec une force de 5 kN, soit une pression 63,7 MPa. Les pastilles crues sont séchées à l'étuve à 100°C pendant une nuit, puis frittées, dans un four Super Kanthal, à 1200°C pendant 1 h, avec une rampe de 20°C/min. Afin de s'affranchir de l'influence de l'état de surface,

évoquée au paragraphe I.4.3, et donc de garantir des états de surface similaires pour les deux compositions, toutes les pastilles sont polies avec du papier abrasif, en carbure de silicium, de grades successifs, dont les diamètres de grains médians sont de 15,3 μm , 6,5 μm et 2,5 μm . Enfin, les pastilles sont lavées pendant 5 minutes dans un bain à ultrasons contenant de l'éthanol technique à 96 %, puis séchées une nuit à l'étuve à 100°C.

III.3.1.2 Analyses biologiques *in vitro*

Pour chaque groupe, 1 g de granules est placé dans un tube de 5 mL contenant le milieu de culture sans FBS (sérum de veau fœtal), à 37°C pendant 24 h. Les tubes sont ensuite centrifugés pendant 10 min à 3000 tr/min. Les surnageants obtenus constituent les « extraits » et des lames de verre sont utilisées comme supports pour les essais indirects de type « live/dead » et de contact focal.

a. Test « live/dead »

La viabilité des cellules au sein des extraits est évaluée, après 24 h d'immersion, à l'aide d'un kit de dosage « live/dead » (Life technologies). Pour chaque groupe, trois essais sont effectués simultanément. Les cellules sont incubées, pendant 30 min à 37°C, avec des réactifs adaptés respectivement aux cellules vivantes et dégradées (4 μM de EthD-1 et 4 μM de calcéïne). Les cellules vivantes et dégradées, colorées respectivement en vert et en rouge, sont observées au microscope à épifluorescence (Zeiss, Axiovert). L'acquisition des images est réalisée avec le logiciel AxioVision 4.8.1 (Zeiss). Les pourcentages de cellules vivantes et dégradées, au sein de chaque extrait, sont déterminés par mesure de fluorescence verte à 645 nm et rouge 530 nm, à l'aide d'un lecteur de plaque à fluorescence.

b. Contact focal indirect

Les cellules sontensemencées avec une densité de 1000 cellules par puits de culture (dans une plaque de 24 puits) et y sont cultivées pendant 24 h. Ces cellules sont ensuite exposées aux extraits pendant une durée t. Un puits contenant la même quantité de cellules et non esposé aux extraits est considéré comme échantillon témoin. Deux temps sont testés ($t = 24 \text{ h}$ et $t = 7 \text{ jours}$). Les échantillons sont ensuite fixés dans du paraformaldéhyde (PFA, 4 %), perméabilisés dans un détergent (Triton x100) et saturés avec de l'albumine de sérum bovin (BSA, 3 %). Ils sont ensuite incubés pendant une nuit avec un anticorps primaire (anti-vinculine, 1:150) puis pendant 1 h avec un anticorps secondaire couplé à un fluorophore

(Alexa-Fluor 488, 1:500). Suite à plusieurs étapes de nettoyage, les échantillons sont incubés pendant 30 min avec une toxine reconnaissant spécifiquement l'actine (phalloïdine couplée à Alexa-Fluor 546, 1:50) et placés sur lame de verre avec un fluorophore DAPI (Sigma) dirigé contre l'ADN afin de marquer les noyaux des cellules.

Pour la quantification des cellules, 8 champs représentatifs de chaque échantillon sont enregistrés numériquement avec des filtres adaptés à la vinculine (de couleur verte), aux fibres d'actine (de couleur rouge) et aux noyaux (de couleur bleue). Le traitement et la superposition des images sont effectués avec les logiciels AxioVision 4.8.1 (Zeiss) et Image Pro Plus 6.0[®]. Les points de contacts focaux des cellules sont évalués par quantification des pixels jaunes, correspondant à la superposition du vert et du rouge. Le nombre de points comptés dans le cas de l'échantillon témoin est pris égal à 100 %. Les résultats des différents groupes sont exprimés en pourcentage par rapport au nombre de points comptés dans le cas de l'échantillon témoin.

c. Activité de la RhoA

Un test spécifique d'activité RhoA (G-LISA) est utilisé pour évaluer la fonctionnalité de la formation des contacts focaux, puisque la protéine RhoA pilote leur maturation [271]. Les cellules sontensemencées avec une densité de 2.10^5 cellules par puits (dans une plaque de 6 puits), et cultivées pendant 24 h. Le sérum est ensuite extrait et les cellules sont cultivées pendant plus de 24 h sans sérum afin d'éliminer les activateurs de RhoA présents dans le sérum. Ensuite, les cellules sont exposées aux extraits pendant 5 min, puis traitées conformément au protocole de dosage (Cytoskeleton, BK121). Le test d'activité RhoA est effectué après seulement 5 minutes d'exposition aux cellules en raison de la rapidité de l'induction de l'activité de la protéine RhoA.

d. Test de viabilité cellulaire

Le test de viabilité cellulaire est réalisé sur la surface polie des pastilles denses. Les cellules sontensemencées dans des tubes de 6 mm de diamètre déposés sur les pastilles de façon à recouvrir une surface précise de la pastille, identique pour tous les échantillons. La densité d'ensemencement est de 500 cellules par puits (dans une plaque de 24 puits) ($n = 3$ pour chaque groupe). Le pourcentage des cellules est évalué après 24 h et 48 h en utilisant une molécule fluorescente DAPI (Sigma). Le comptage est effectué sur 8 champs représentatifs

pour chaque échantillon, avec le logiciel ImageProPlus 6.0[®]. Les cellulesensemencées sur des lamelles de verre adhérentes sont utilisées comme groupe témoin.

Les analyses statistiques des résultats de l'étude menée *in vitro* sont réalisées dans les conditions décrites en annexe IX.

III.3.2 Résultats de l'étude de biocompatibilité *in vitro*

III.3.2.1 Caractérisation des substrats

Les résultats des analyses de phases réalisées sur les granules et les pastilles HA et SiHA frittés sont conformes aux résultats présentés au paragraphe II.2, malgré les différences de préparation et de mise en forme des substrats.

Les granules d'HA et de SiHA possèdent des surfaces spécifiques respectives de $0,24 \pm 0,02 \text{ m}^2/\text{g}$ et $0,74 \pm 0,01 \text{ m}^2/\text{g}$ (méthode BET, annexe III). Les micrographies MEB (annexe VIII) révèlent une morphologie aléatoire et similaire des granules HA et SiHA (Figure 89-a et Figure 89-d). Les observations à plus fort grossissement montrent une surface quasiment dense pour les deux matériaux (Figure 89-b et Figure 89-e), justifiant les faibles valeurs de surface spécifique. Enfin, les différences de surfaces spécifiques entre les granules des deux compositions s'expliquent par les légères différences de microstructure observées. En particulier, les granules SiHA possèdent des grains de plus petite taille que les granules HA, ce qui conduit à une surface spécifique plus élevée des granules de SiHA (Figure 89-c et Figure 89-f).

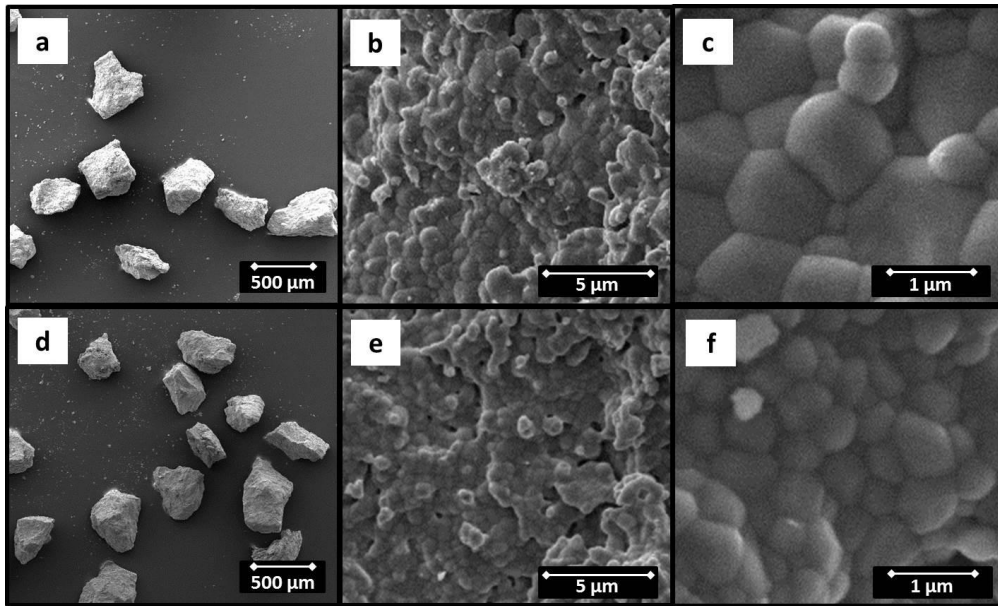


Figure 89 : Micrographies MEB des granules HA (a, b, c) et SiHA (d, e, f), frittés à 1200°C pendant 1 h

Les micrographies MEB des pastilles polies HA et SiHA sont présentées en Figure 90. Les pastilles des deux compositions présentent des microstructures denses similaires. La seule différence notable entre les deux compositions est une taille de grain légèrement plus faible dans le cas des pastilles de SiHA. Les topographies de surface des pastilles HA et SiHA avant polissage, déterminées par AFM (Annexe X) et présentées en Figure 91, confirment les différences microstructurales observées entre les deux compositions.

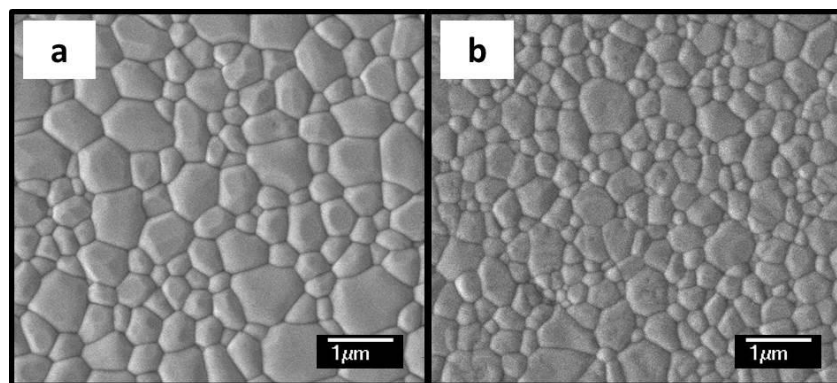


Figure 90 : Micrographies MEB des pastilles HA (a) et SiHA (b), frittées à 1200°C-1 h, et polies

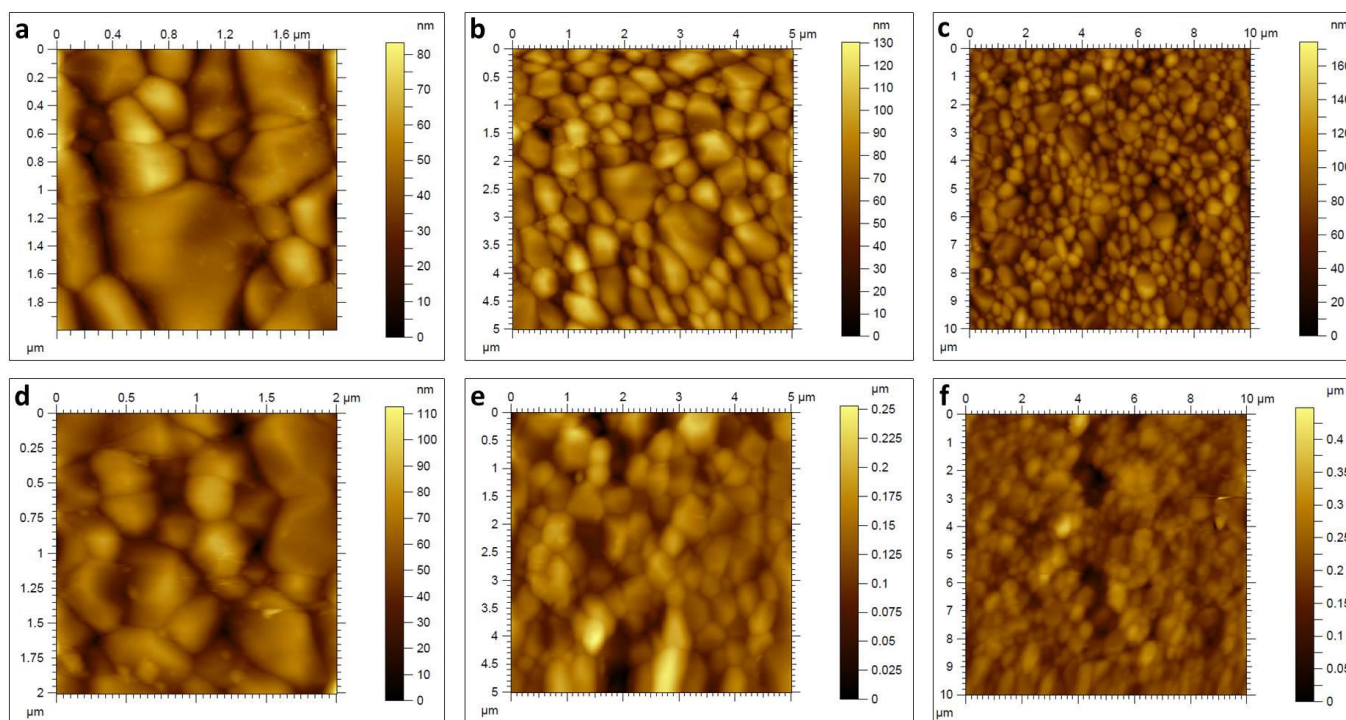


Figure 91 : Topographies AFM des pastilles HA (a, b, c) et SiHA (d, e, f), frittées à 1200°C pendant 1 h, non polies

Le paramètre de rugosité Ra, généralement rencontré dans la littérature, ne permet pas, à lui seul, de rendre compte des inhomogénéités d'état de surface des pastilles non polies. Les paramètres d'état de surface Ra, Rq, Sa et Sq (annexe X), calculés sur des scans de largeurs 2, 5 et 10 μm, mettent en évidence des surfaces irrégulières avec une rugosité moyenne élevée (Tableau 29). En particulier, l'écart élevé entre les valeurs de Rq et Sq, calculées sur des topographies de surface importante (10 μm × 10 μm), signale de fortes inhomogénéités d'état de surface.

Surface scannée	Composition	Sq (nm)	Sa (nm)	Rq (nm)	Ra (nm)
2 μm × 2 μm	HA	12,2	9,9	8,6	6,7
	SiHA	13,6	10,9	11,5	9,8
5 μm × 5 μm	HA	37,8	28,9	11,2	9,3
	SiHA	43,8	33,7	13,3	10,3
10 μm × 10 μm	HA	21,9	16,0	9,0	7,4
	SiHA	40,6	30,7	11,7	9,3

Tableau 29 : Paramètres d'état de surface calculés à partir des topographies AFM effectuées sur des pastilles HA et SiHA frittées non polies

L'étape de polissage permet, pour les deux compositions, l'obtention d'une rugosité moyenne plus faible et d'un état de surface plus homogène. Les valeurs des paramètres d'état de surface sont beaucoup plus faibles et du même ordre de grandeur, quelle que soit la composition chimique de l'échantillon (Tableau 30 et Tableau 31).

Surface	Composition	Sq (nm)	Sa (nm)	Rq (nm)	Ra (nm)
Non polie	HA	12,2	9,9	8,6	6,7
	SiHA	13,6	10,9	11,5	9,8
Polie	HA	6,8	4,5	7,1	4,9
	SiHA	5,8	3,6	4,9	2,3

Tableau 30 : Paramètres d'état de surface calculés à partir des topographies AFM effectuées sur des pastilles HA et SiHA frittées, non polies et polies, avec une surface de scan de $2\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$

Les résultats du test de reproductibilité, évalués sur 5 scans de largeur $5\ \mu\text{m}$, sur une pastille SiHA polie, sont présentés dans la dernière ligne du Tableau 31. Les écarts observés entre les différentes mesures, effectuées sur la même pastille, sont du même ordre de grandeur que les écarts observés entre les paramètres de surface (Sq et Sa) des pastilles polies de HA et ceux des pastilles polies de SiHA (écart entre HA et SiHA de 1 nm pour Sq et de 0,9 nm pour Sa, Tableau 30). Les états de surface des pastilles polies des deux compositions sont donc totalement similaires.

Surface	Composition	Sq (nm)	Sa (nm)	Rq (nm)	Ra (nm)
Non polie	SiHA	43,8	33,7	13,3	10,3
Polie	SiHA	$6,1 \pm 1,6$	$4,0 \pm 0,8$	$3,5 \pm 1,7$	$2,1 \pm 0,9$

Tableau 31 : Paramètres d'état de surface calculés à partir des topographies AFM effectuées sur une pastille SiHA frittée, non polie puis polie, avec une surface de scan de $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$ (les valeurs renseignées pour la pastille polie résultent de 5 topographies effectuées sur des zones sélectionnées aléatoirement sur la pastille)

Le polissage permet donc l'obtention de surfaces planes et similaires pour les deux compositions chimiques. Cette étape de préparation des substrats garantit l'évaluation de

l'influence de la composition chimique des matériaux lors des analyses *in vitro* en s'affranchissant des effets de topographie.

III.3.2.2 Résultats de l'évaluation biologique *in vitro*

Les résultats du test « live/dead » indiquent que plus de 85 % des cellules sont toujours en vie après 24 h de contact avec les extraits, quels que soient les échantillons (HA, HAins, SiHA, SiHAins) (Figure 92). Les seules variations significatives sont observées dans le cas du contrôle positif, noté C+. Il s'agit d'une diminution de la viabilité des cellules (* $p < 0,05$) et d'une augmentation du taux de cellules dégradées (# $p < 0,05$). Aucune différence significative n'est détectée pour les quatre groupes expérimentaux et pour le contrôle négatif, noté C-. La mise en contact des cellules avec les extraits des quatre groupes ne semble donc pas défavorable à leur survie.

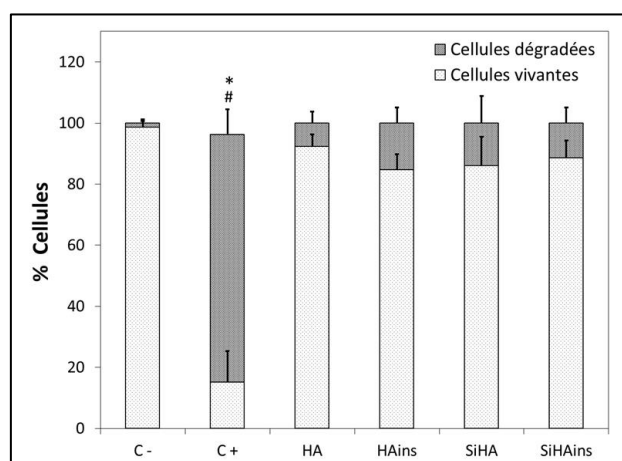


Figure 92 : Test « live/dead » des cellules MC3T3 en contact avec les extraits d'HA, HAins, SiHA et SiHAins, après 24 h ($n = 3$ pour chaque groupe). * : diminution significative de la viabilité des cellules ($p < 0,05$); # : augmentation significative du taux de cellules dégradées ($p < 0,05$)

En ce qui concerne les contacts focaux à 24 h, les images reportées dans la Figure 93-a montrent les morphologies représentatives des différents groupes. L'analyse par immunofluorescence des groupes HA et SiHAins montre des cellules très bien étalées, des fibres de stress visibles et un taux élevé de points de contacts focaux. Ces observations sont

similaires à celles effectuées sur le groupe témoin, ce qui suggère une réponse satisfaisante des cellules suite à leur exposition aux extraits.

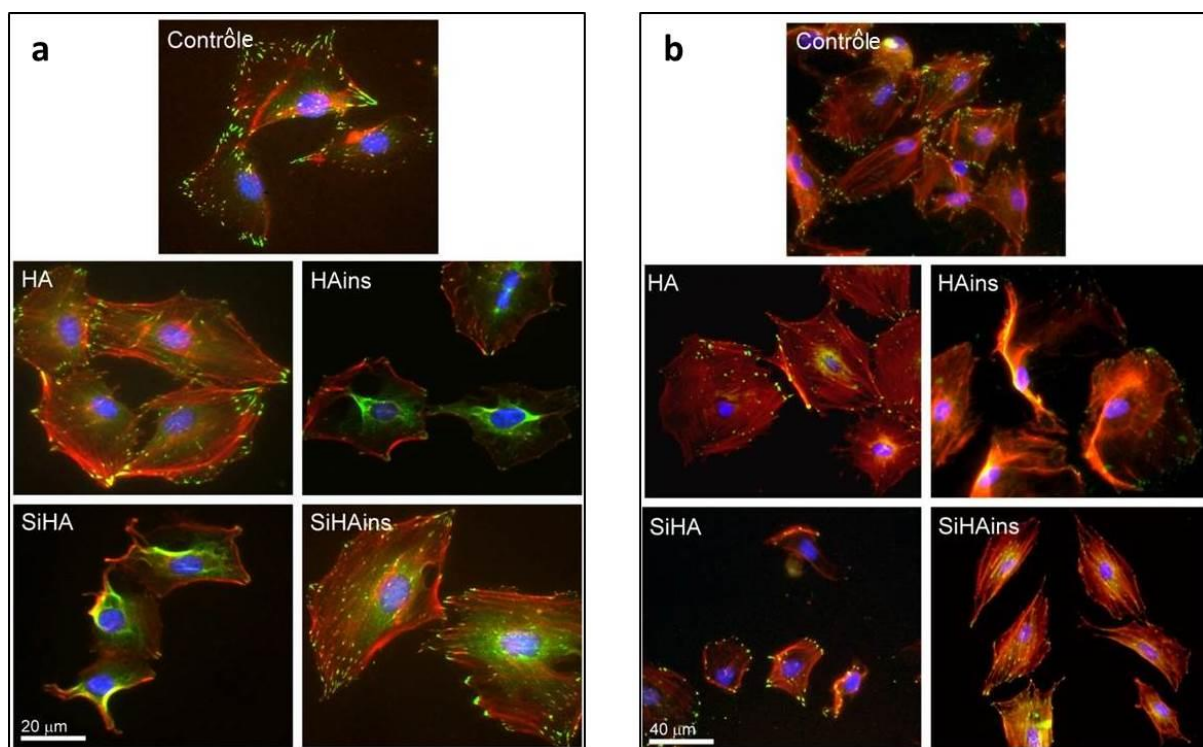


Figure 93 : Immunofluorescence de l'adhésion focale et des fibres de stress dans des cellules MC3T3 exposées aux extraits d'HA, HAins, SiHA et SiHAins, après 24 h (a) ou 7 jours (b). La vinculine est marquée en vert et l'actine en rouge. Les deux protéines sont co-distribuées aux points d'adhésion focale (en jaune).

L'analyse qualitative, effectuée après 24 h, par immunofluorescence des points de contacts focaux, peut être confirmée par quantification de l'activité de la RhoA puisque celle-ci pilote la maturation des contacts focaux [271]. Comme prévu, une augmentation de l'activité de la protéine RhoA est observée dans le cas du contrôle positif (Rho+) (Figure 94-a). Une augmentation de l'activité de la protéine RhoA est également observée dans le cas du groupe HA, mais cet effet semble être inhibé par la présence d'insuline (groupe HAins). En revanche, aucune augmentation de l'activité de la protéine RhoA n'est observée dans le cas du groupe SiHA. De plus, dans le cas de SiHA, l'activité de la protéine RhoA semble être supérieure en présence d'insuline (groupe SiHAins) que dans le cas du matériau non imprégné (groupe SiHA). L'effet de l'extrait de l'HA sur les cellules est caractérisé par la formation de fibres de stress (Figure 93-a), ce qui est en accord avec l'induction de l'activité de la protéine RhoA. L'observation des fibres de stress dans le cas du groupe SiHAins est

également en accord avec un niveau correct d'activité de la protéine RhoA par rapport aux groupes HAins et SiHA. Ces résultats suggèrent donc un rôle potentiel de l'insuline, adsorbée à la surface de SiHA, sur la faculté des cellules à adhérer.

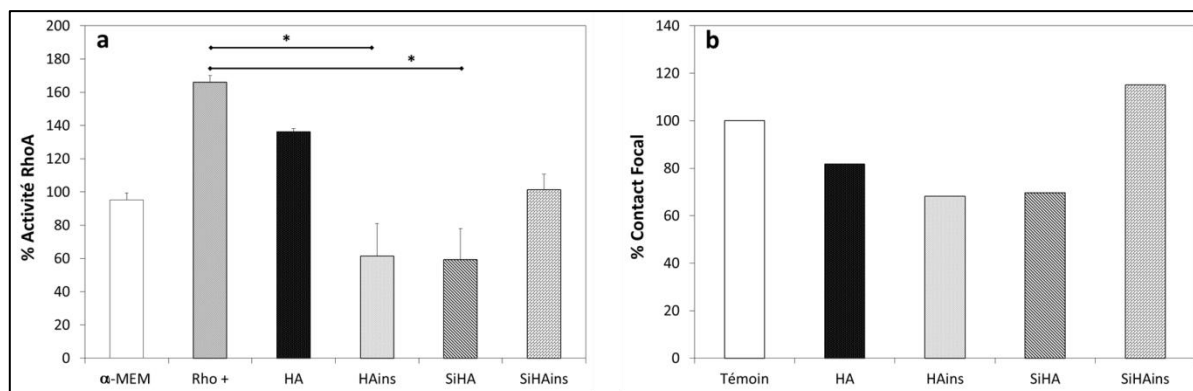


Figure 94 : (a) Quantification de l'activité de la RhoA engendrée par les extraits d'HA, HAins, SiHA et SiHAins, mesurée par kit G-LISA® (* $p < 0.05$); (b) Taux de contacts focaux des cellules MC3T3 exposées aux extraits de HA, HAins, SiHA et SiHAins, après 7 jours.

La bonne affinité des cellules pour les lames de verre est conservée pendant une durée plus étendue (7 jours) (Figure 93-b). Aucune différence n'est observée entre les groupes HA et HAins. Pour ces deux groupes, les cellules ont bien adhéré au support et sont bien étendues. De plus, le léger effet néfaste de l'insuline sur les contacts focaux, observé après 24 h dans le cas de l'HA, a disparu. De 24 h à 7 jours, la quantité de contacts focaux diminue pour SiHAins et augmente pour SiHA, mais dans les deux cas, la morphologie des cellules diffère de celle observée dans le cas des groupes HA et HAins. Les cellules exposées aux extraits SiHA apparaissent très petites et celles exposées aux extraits SiHAins sont plus allongées et également plus petites que dans le cas de l'extrait d'HA et du groupe témoin. Pour tous les groupes, le taux de contacts focaux, après 7 jours, est supérieur à 70 % (Figure 94-b).

Sur la Figure 95, sont reportées les valeurs de croissance de population cellulaire sur les différents substrats (pastilles polies d'HA, HAins, SiHA, et SiHAins) après 24 h et 48 h suivant l'ensemencement. Aucune différence significative n'est détectée inter-groupes ni entre les 4 groupes (HA, HAins, SiHA, SiHAins) et le groupe témoin. Les substrats ne sont donc ni toxiques ni particulièrement stimulants pour la croissance de la population cellulaire.

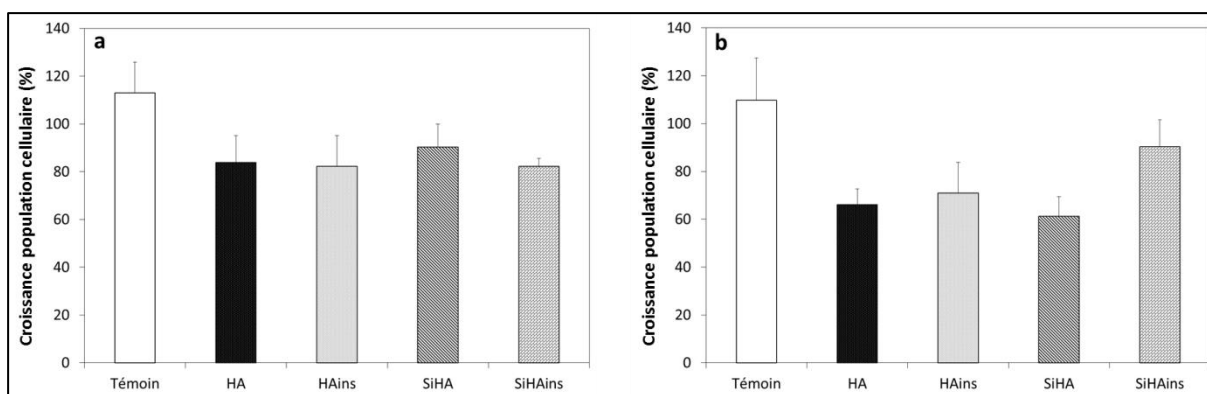


Figure 95 : Croissance de la population cellulaire sur les pastilles HA, HAins, SiHA et SiHAins, après 24 h (a) et 48 h (b) suivant l'ensemencement

En conclusion, seuls les extraits de SiHA semblent induire un changement de morphologie des cellules *in vitro*. Mais les analyses directes et indirectes mettent en évidence une bonne viabilité des cellules et aucun effet significatif de la composition chimique du matériau et de la présence d'insuline adsorbée à la surface du matériau, sur la croissance de la population cellulaire, n'est détecté. Par conséquent, les quatre groupes testés (HA, HAins, SiHA et SiHAins) sont considérés comme biocompatibles et peuvent donc être utilisés pour l'étude *in vivo*.

III.4 Etude *in vivo*

III.4.1 Matériels et méthodes

Les implants sont des granules mis en forme et caractérisés dans les conditions décrites au paragraphe III.3.1.1.a (p 157).

Les implantations sous-cutanées sont réalisées, selon la norme ISO 10993-6 :2007¹⁰, sur des souris âgées de 50 à 60 jours pesant 25-35 grammes. Cinq groupes de 5 individus sont étudiés. Les groupes « HA », « HAins », « SiHA » et « SiHAins » correspondent aux

¹⁰ ISO 10993-6:2007 : Biological evaluation of medical devices -- Part 6: Tests for local effects after implantation.

implantations respectives de granules d'HA, d'HA imprégnés d'insuline, de SiHA et de SiHA imprégnés d'insuline. Les imprégnations d'insuline sont réalisées avec des solutions d'insuline à 20 µg/mL, avec un tampon phosphate à 0,01 M, à 37°C et pH 7,4, pendant 24 h. La stérilisation des substrats est effectuée par irradiation gamma, pendant 12 h, avec une source cobalt 60, 15 KGy, 19,72 Gy/min. Aucun granule n'est implanté dans le groupe « témoin ». Trois durées d'implantation sont testées : 1, 3 et 9 semaines.

Les animaux sont anesthésiés avec une injection intramusculaire de Ketamina à 75 mg/kg (Veltbrands, Brésil) et de Rompun à 1,5 mL/kg (Veltbrands, Brésil). Suite à l'anesthésie, une incision de 10 mm est réalisée dans la région lombaire. Une masse de 60 mg de granules est introduite dans la plaie qui est ensuite suturée avec du Nylon 5,0 (Ethicon, Johnson and Johnson, Brésil) (Figure 96). Enfin, les souris sont euthanasiées avec l'anesthésiant précisé précédemment.

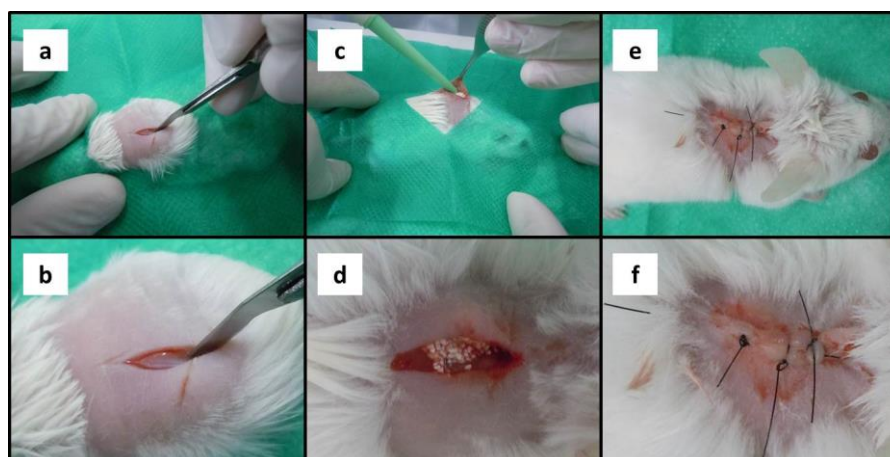


Figure 96 : Implantation sous-cutanée des granules : a) incision ; b) incision, agrandissement ; c) implantation ; d) implantation, agrandissement ; e) suture ; f) suture, agrandissement

Les implants et les tissus adjacents sont explantés des souris pour les groupes HA, HAins, SiHA et SiHAins. Un fragment de tissu, de taille et de morphologie similaires, est également extrait pour le groupe témoin. Tous les extraits sont fixés dans une solution de formaldéhyde à 4 % dilué dans un tampon phosphate à 0,1 M (pH 7,2), pendant 48 h, à température ambiante. Ils sont ensuite incorporés dans du Paraplast plus (Sigma, St Louis, USA), puis coupés en sections de 5 µm. Ces coupes sont colorées à l'hématoxyline et éosine

(HE) pour l'observation en microscopie optique (Jenaval Universal, Carl Zeiss-Jena) et au bleu de toluidine pour l'évaluation histomorphométrique.

Les mastocytes sont des cellules granuleuses présentes dans les tissus conjonctifs qui produisent et libèrent des médiateurs physiologiques intervenant dans le processus d'inflammation. La densité de mastocytes est évaluée après 9 semaines d'implantation. Dix champs consécutifs sont capturés dans chaque coupe histologique. Ces zones correspondent à la région d'implantation du biomatériau. La capture des images est réalisée avec le logiciel Image Pro Plus (version 4.5.0.29, Media Cybernetics, Inc.) et leur taille est normalisée. Suite à l'acquisition des images, un masque constitué d'une grille contenant 500 points d'intersection est superposé à celles-ci. Les mastocytes, marquées par le bleu de toluidine, sont comptabilisées lorsque leur position coïncide avec un point d'intersection de la grille du masque (Figure 97). La densité de mastocytes de chaque image, notée D_m et exprimée en %, est évaluée selon l'Équation 16.

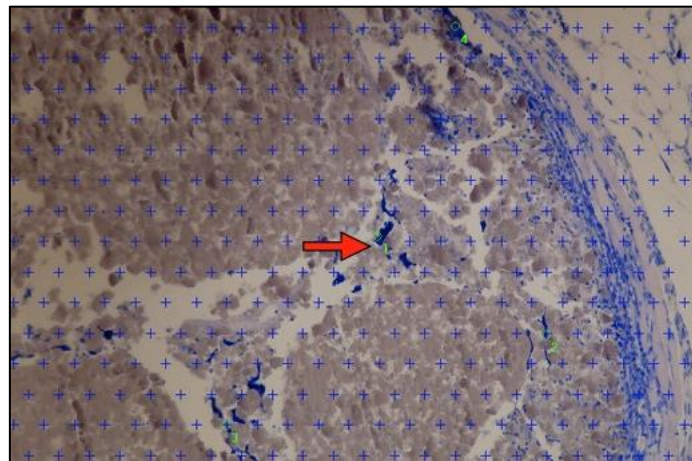


Figure 97 : Superposition de la grille de comptage sur l'image d'une coupe histologique (la flèche signale un point d'intersection du masque coïncidant avec un mastocyte coloré en bleu)

$$D_m (\%) = \frac{\text{nombre de points coïncidant avec un mastocyte}}{\text{nombre de points total de la grille}} \times 100$$

Équation 16 : Calcul de la densité de mastocytes

III.4.2 Résultats et discussion

Après une, trois et neuf semaine(s) suivant l'implantation sous-cutanée, l'état de santé de tous les individus se révèle satisfaisant et aucune infection n'est détectée macroscopiquement. Les résultats histologiques varient avec la durée d'implantation, en termes de cicatrisation et de remodelage des tissus sous-cutanés conjonctifs. Une infiltration de cellules mononucléaires est observée dans les tissus conjonctifs autour du matériau pour tous les groupes après une semaine d'implantation. Cette réponse inflammatoire est très courante pour cette courte durée d'implantation. Les observations effectuées après une semaine d'implantation permettent donc la validation de la méthode, en termes d'échantillonnage et de marquage, pour l'évaluation de la réponse inflammatoire à plus long terme.

Après 3 et 9 semaines d'implantation, tous les groupes présentent une réponse inflammatoire discrète avec des infiltrations dispersées de mastocytes (colorés en bleu) au sein du tissu conjonctif (coloré en rose) entourant le biomatériau (Figure 98-a).

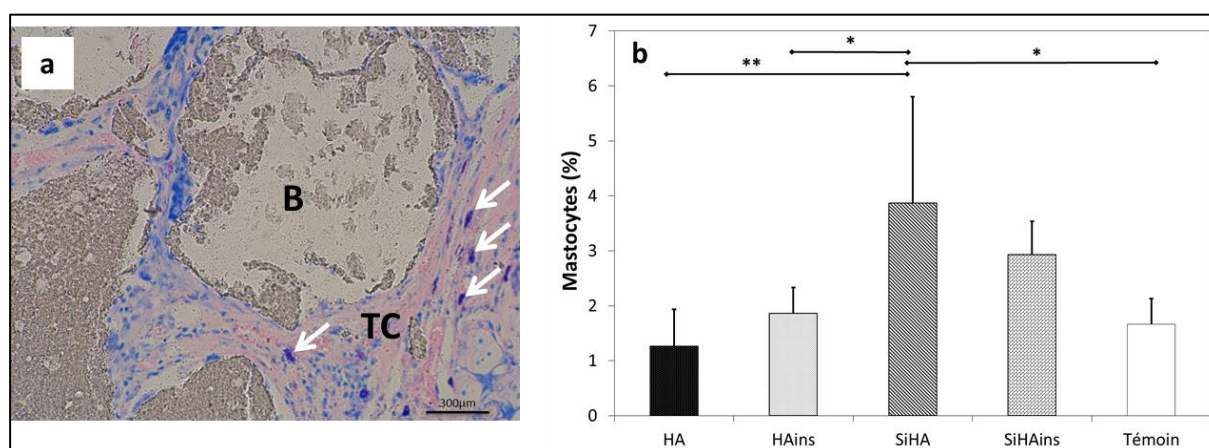


Figure 98 : Réponse inflammatoire après 9 semaines d'implantation sous-cutanée. (a) Micrographie d'une section du groupe HA, représentative du groupe (B : biomatériau (gris), TC : tissu conjonctif (rose), les flèches signalent la présence de mastocytes marqués en bleu) ; (b) Analyse statistique des mastocytes (* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$)

Après neuf semaines d'implantation (Figure 98-b), l'analyse histomorphométrique ne révèle pas de différence significative entre les groupes HA et HAins, d'une part, ni entre les

groupes SiHA et SiHAins d'autre part ($p > 0,05$). Par conséquent, aucune influence significative de l'adsorption d'insuline sur la réponse inflammatoire n'est détectée, par comparaison de la réponse générée par les implants nus et les implants imprégnés, quelle que soit la composition du matériau. Cette absence d'effet significatif de l'insuline à 9 semaines d'implantation peut être due à une libération beaucoup plus précoce de la protéine.

De la même façon, aucune différence significative n'est observée entre le groupe HA et le groupe témoin ni entre le groupe HAins et le groupe témoin. En revanche, l'analyse statistique révèle une réponse inflammatoire significativement plus élevée pour SiHA que pour HA ($p < 0,01$) et HAins ($p < 0,05$). La différence de réponse inflammatoire entre le groupe SiHA et le groupe témoin est également statistiquement significative ($p = 0,037$). Ces résultats indiquent une influence négative de la présence du silicium au sein de la structure apatitique, sur la réponse inflammatoire à 9 semaines d'implantation. Cependant, la densité de mastocytes reste faible par rapport à celle du groupe témoin, en comparaison avec la réponse inflammatoire observée après l'implantation de certains substituts commercialisés [272,273]. Le matériau SiHA se révèle viable et peut donc être utilisé pour la suite de l'étude biologique.

III.5 Effet de la géométrie des macropores sur le comportement cellulaire

III.5.1 Matériels et méthodes

III.5.1.1 Préparation et caractérisation des substrats

Des pièces biocéramiques sont mises en forme par microstéréolithographie avec la suspension $(R/D)_{\max}$ -P55 (Tableau 17, p 99), un temps d'exposition de 0,83 s et une épaisseur de couche de 250 μm . Le masque utilisé pour la mise en forme des pièces est présenté en Figure 99. Toutes les couches ($n=10$) sont réalisées avec un masque identique. Les substrats sont donc des disques comportant des macropores totalement traversants et perpendiculaires aux faces des disques. Une photographie des substrats en cru, vus de dessus, est présentée en Figure 100.

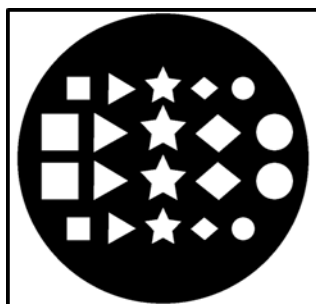


Figure 99 : Masque utilisé pour la mise en forme des substrats pour les tests in-vitro

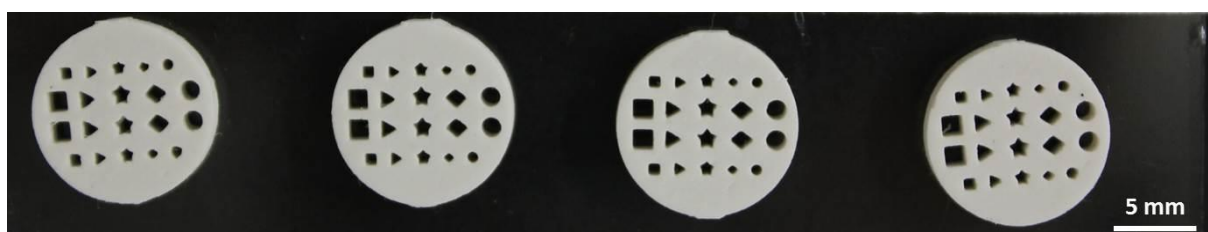


Figure 100 : Photographie de substrats de 10 couches en cru (vus de dessus)

Les disques macroporeux sont déliantés puis frittés à 1200°C pendant 2h dans les conditions établies et décrites au paragraphe II.5.2 (p 126). L'épaisseur et la largeur des disques frittés, sont mesurées au pied à coulisse. Les dimensions des pores sont définies à l'aide des quatre grandeurs précisées dans le Tableau 32. Ces grandeurs sont évaluées à partir des photographies réalisées avec une loupe binoculaire (Figure 101). Les calculs dimensionnels sont effectués avec les valeurs des longueurs et des surfaces, exprimées en px et px² respectivement, obtenues à partir du logiciel Paint.NET. Les valeurs des longueurs sont également converties en μm , à titre indicatif, à l'aide des barres d'échelle.

Paramètre dimensionnel	Description
l	Longueur d'un côté du polygone (ou diamètre du cercle)
P	Périmètre de la géométrie du pore
D_i	Diamètre du cercle inscrit dans la géométrie du pore
S_0	Surface du pore

Tableau 32 : Grandeurs utilisées pour la description dimensionnelle des macropores

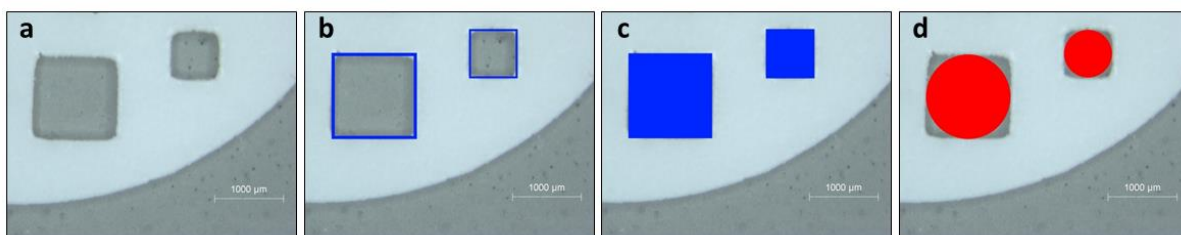


Figure 101 : Photographie d'un substrat vu de dessus (a), périmètre P (b) et surface S_0 (c) (colorés en bleu) des domaines définis par les sections horizontales des macropores ; cercles de diamètre D_i inscrits dans les géométries de ces domaines (colorés en rouge) (d)

Les substrats sont stérilisés à l'autoclave (Pbi international) pendant 20 minutes à 121°C, avant utilisation.

III.5.1.2 Evaluation biologique

Les méthodes décrites dans ce paragraphe sont similaires à celles décrites au paragraphe III.3 (p 157). Les différences notables concernent les équipements, les fournisseurs et certains détails de protocoles propres aux laboratoires respectifs (CBPF, Brésil, pour le paragraphe III.3 et SPCTS, France, pour ce paragraphe).

a. Cultures cellulaires

Les cellules préostéoblastes MC3T3 murines (DSMZ, Braunschweig, Allemagne) sont cultivées dans un incubateur (Binder) avec un taux de CO₂, un taux d'humidité et une température fixés respectivement à 5 %, 100 % et 37°C. La totalité des manipulations est effectuée dans des conditions stériles. Les milieux et solutions utilisés pour les cultures de cellules sont préchauffés à 37°C. Le milieu de culture standard est l' α -MEM (Life Technologies) complété avec 10 % de FBS (Biochrom), 1% de L-glutamine (200 mM) et 2 % de pénicilline / streptomycine (10000 µg/mL / 10000 µg/mL) (Biochrom).

Le stockage des suspensions cellulaires à long terme nécessite une congélation à -196°C. Afin d'éviter tout endommagement des cellules par des cristaux de glace qui peuvent se produire pendant le processus de congélation, du DMSO (AppliChem) (10 % de la concentration finale) est ajouté à la suspension cellulaire. Les cellules sont congelées par lots d'environ 1×10^6 . Les cellules sont décongelées rapidement par une brève incubation à 37°C

jusqu'à ce que leur aspect devienne liquide. Cette solution est transvasée dans un tube contenant 10 mL de milieu. Après une centrifugation à 200 g (centrifugeuse Awel, MF 20-R), les cellules sont remises en suspension etensemencées dans un tube de culture cellulaire.

Après extraction du milieu, la couche cellulaire est rincée 2-3 fois au PBS (Life Technologies). Pour permettre le détachement des cellules, une solution de Trypsine/EDTA (x1) (Life Technologies) est ajoutée aux cellules et le tout est incubé à 37°C jusqu'à ce que les cellules se remettent en suspension. Le phénomène est stoppé par ajout d'un milieu de culture contenant 10 % de FBS et la suspension cellulaire est transvasée dans un tube de 50 mL. Après une étape de centrifugation de 5 min à 200 g, le surnageant est évacué et les cellules sont remises en suspension dans 1 mL de PBS ou de milieu de culture. Dans les étapes suivantes, un dixième des cellules est ensemencé dans un nouveau tube de culture cellulaire et les cellules sont comptées. Ce processus est effectué tous les 3-4 jours. Pour le comptage, après centrifugation pendant 5 min à 200 g, le surnageant est extrait et les cellules sont remises en suspension dans 1 mL de PBS. 10 µL de la suspension cellulaire sont ajoutés à 90 µL de bleu de Trypan (Sigma). Une deuxième dilution est éventuellement réalisée. 20 µL de suspension cellulaire sont placés dans une chambre de Malassez et les cellules sont comptées au microscope (Zeiss, AXIO Imager M2).

b. Ensemencement

Les échantillons sont incubés pendant 60 min dans le milieu de différenciation, en incubateur, puis sont déposés dans des puits de culture de plaques à 24 puits de surface 2 cm². Les cellules MC3T3 sont ensemencées sur les échantillons avec une densité de 50000 cellules par puits de culture, c'est-à-dire 25000/cm², et cultivées pendant des durées de 7 jours (J7) et 14 jours (J14). Parallèlement, deux autres puits, ne contenant aucun échantillon, sont ensemencés avec 25000 et 50000 cellules respectivement. Le milieu de différenciation, constitué d'α-MEM + 10 % FBS + 10 mM β-glycerophosphate (AppliChem) + 50 µg/mL acide ascorbique (AppliChem) + 1 % Peniciline/Streptomycine + 1 mM L-Glutamine, est renouvelé tous les deux jours, excepté le weekend. Les échantillons sont fixés, pendant 10 min à température ambiante, dans du paraformaldéhyde (PFA, 4 %, AppliChem) puis rincés trois fois au TBS x1. Ils sont ensuite perméabilisés pendant 15 min à température ambiante dans un détergent (0,1 % Triton X-100 dilué dans du PBS) (VWR) puis rincés trois fois au PBS. Une saturation est effectuée pendant 30 min à température ambiante avec une solution d'albumine de sérum bovin (BSA) diluée à 1 % dans du PBS. Deux séries

d'ensemencement sont réalisées indépendamment. La série 1 correspond à l'ensemencement des échantillons A (J7) et B (J14). La série 2 correspond à l'ensemencement des échantillons C (J7) et D (J14).

c. Marquage et observations

Les échantillons sont incubés, dans l'obscurité, pendant 30 min avec une toxine (la phalloïdine) reconnaissant spécifiquement l'actine, et couplée à un fluorophore 488 (Thermo Scientific, excitation/émission : 495/521 nm). Après trois rinçages au PBS, les échantillons sont incubés, dans l'obscurité, pendant 5 min avec un fluorophore (Hoechst 33342, Thermo Scientific, concentration finale : 12,3µg/ml) dirigé contre l'ADN afin de marquer les noyaux des cellules. Après trois rinçages au PBS et un rinçage à l'eau distillée, les échantillons sont montés avec un milieu de montage (Dako, Agilent Technologies) afin d'optimiser l'observation des échantillons en microscopie à fluorescence et de retarder la disparition de la fluorescence. Les observations sont réalisées à l'aide d'un microscope (Zeiss, Axio Imager M2), en lumière naturelle puis avec des filtres adaptés aux marqueurs des fibres d'actine (de couleur rouge) et des noyaux (de couleur bleue). Les images numériques sont enregistrées avec une caméra monochromatique (Axio Mrm, Zeiss) à l'aide du logiciel Axio vision Rel. 4.8 (Zeiss).

d. Test de viabilité cellulaire

Un test de viabilité cellulaire est effectué pour chaque série d'ensemencement afin de vérifier l'absence d'effet toxique ou antiprolifératif des échantillons. Un colorant (Alamar blue, Pierce, Thermo Scientific) est introduit dans le milieu de culture à hauteur de 10 %. Après 15 min d'incubation en incubateur, 50 µL sont transvasés dans des plaques noires de 96 puits puis analysés avec un lecteur de plaque (BMG –Labtech, Fluostar Optima, excitation/émission : 530-560/590 nm). Les échantillons sont rincés au PBS afin d'éliminer l'Alamar Blue et sont immergés dans un milieu de différenciation. Deux autres puits, ne contenant aucun échantillon, ensemencés avec 25000 et 50000 cellules respectivement, sont pris comme témoins.

e. Détermination de la surface des pores recouverte par les cellules

Dans la littérature, l'étude de la colonisation cellulaire *in vitro* est généralement effectuée en ramenant la surface recouverte de cellules à la surface des pores. Pour chaque

pore de chaque échantillon, le pourcentage de surface du pore recouverte par les cellules, appelé taux de recouvrement et noté τ_c , est déterminé en calculant le rapport de la surface recouverte de cellules, notée A , sur la surface totale du pore S_0 (Équation 17). Ces deux surfaces sont mesurées, en px^2 , sur les micrographies à l'aide du logiciel Paint.NET. Pour chaque pore, ce calcul est effectué à partir des observations effectuées en lumière naturelle, avec un filtre adapté au marqueur des fibres d'actine et avec un filtre adapté au marqueur des noyaux (Figure 102).

$$\tau_c (\%) = \frac{A}{S_0} \times 100$$

Équation 17 : Calcul du taux de recouvrement, noté τ_c (A : surface recouverte par les cellules ; S_0 : surface du pore ; surfaces mesurées en px^2 sur les micrographies)

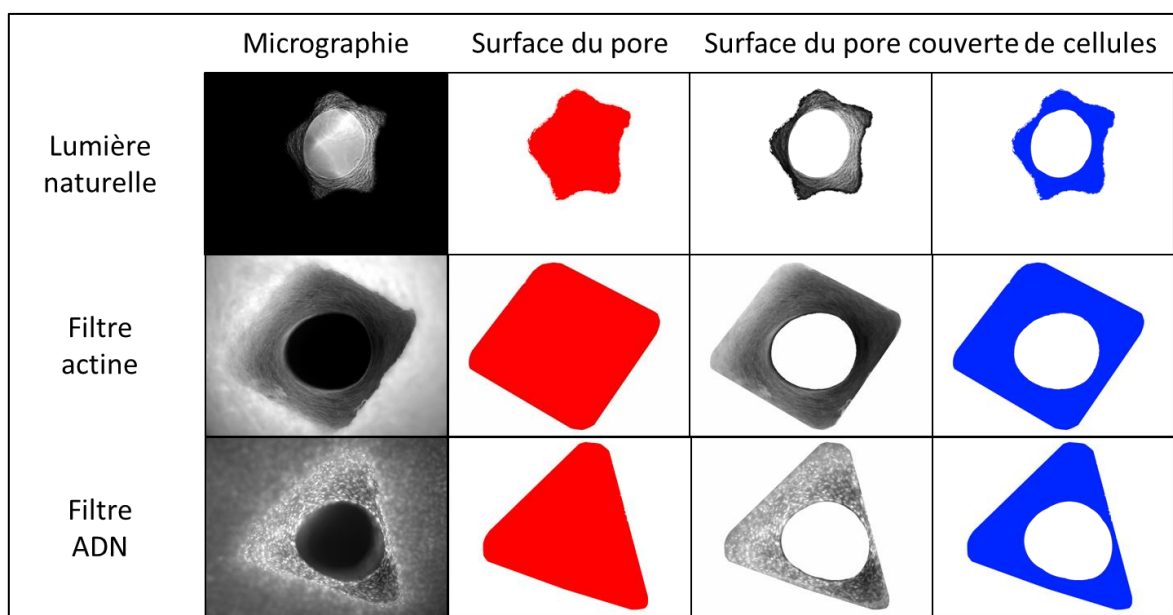


Figure 102 : Exemples de traitement de micrographies pour le calcul du taux de recouvrement

III.5.2 Résultats et discussion

III.5.2.1 Caractérisation des substrats

Les substrats sont fabriqués dans les mêmes conditions que les échantillons présentés dans le chapitre II. Ils sont frittés à 1200°C pendant 2 h et présentent des caractéristiques similaires à celles décrites précédemment pour ces conditions de frittage.

L'épaisseur et la largeur des disques frittés, mesurées au pied à coulisse, sont de $2,1 \pm 0,1$ mm et $9,1 \pm 0,2$ mm (valeurs moyennes obtenues sur 6 pièces). Les caractéristiques dimensionnelles des macropores présents sur les substrats, obtenus à partir des micrographies, sont indiquées dans le Tableau 33.

Géométrie (grande)	l mesuré (μm)	P calculé (μm)	D _i mesuré (μm)	S ₀ calculé (mm ²)
Cercle	1021	3206	1021	0,78
Losange	814	3257	798	0,62
Etoile	267	2667	702	0,54
Triangle	907	2720	582	0,43
Carré	1087	4349	1087	1,12

Géométrie (petite)	l mesuré (μm)	P calculé (μm)	D _i mesuré (μm)	S ₀ calculé (mm ²)
Cercle	567	1782	567	0,24
Losange	394	1575	391	0,14
Etoile	195	1949	538	0,32
Triangle	600	1800	426	0,24
Carré	621	2482	621	0,37

Tableau 33 : Dimensions des géométries présentes sur les substrats (*l* : longueur d'un côté du polygone ou diamètre du cercle ; *P* : périmètre ; *D_i* : diamètre du cercle inscrit ; *S₀* : surface)

III.5.2.2 Test de viabilité cellulaire

Les résultats du test de viabilité cellulaire de la première série sont présentés en Figure 103. Quelle que soit la durée de culture, le taux de croissance de la population cellulaire est similaire pour les échantillons et pour les témoins. L'absence de différence significative entre les échantillons et les groupes témoins permet de valider la biocompatibilité des substrats. Des résultats semblables sont obtenus lors de la deuxième série.

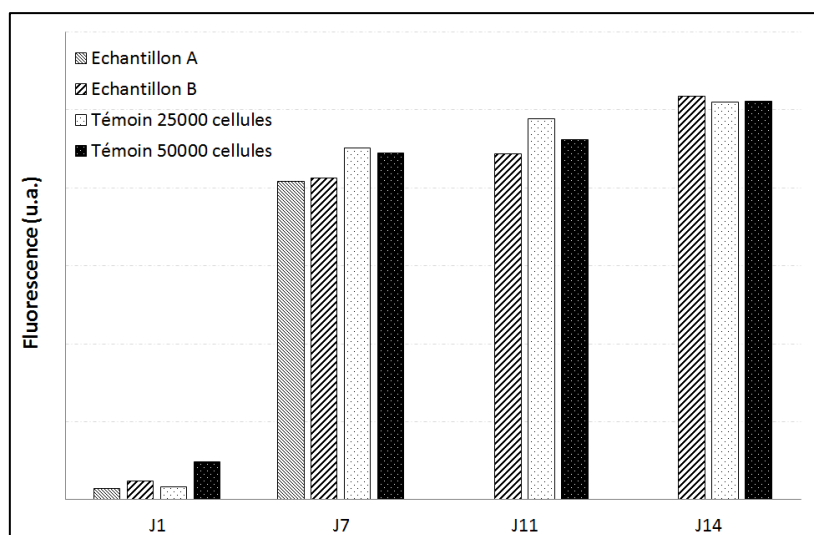


Figure 103 : Croissance de la population cellulaire sur des substrats de SiHA réalisés par μ SL et frittés à 1200°C pendant 2 h (première série) (ensemencement à 25000 cellules par cm^2 , cultures de 7 et 14 jours, test réalisé avec le colorant Alamar blue)

III.5.2.3 Colonisation des pores

La Figure 104 présente les schémas des échantillons sur lesquels sont reportées les valeurs de taux de recouvrement τ_c (Équation 17) calculées après 7 jours puis 14 jours d'ensemencement, pour la première série de cultures, à partir des micrographies effectuées en lumière naturelle.

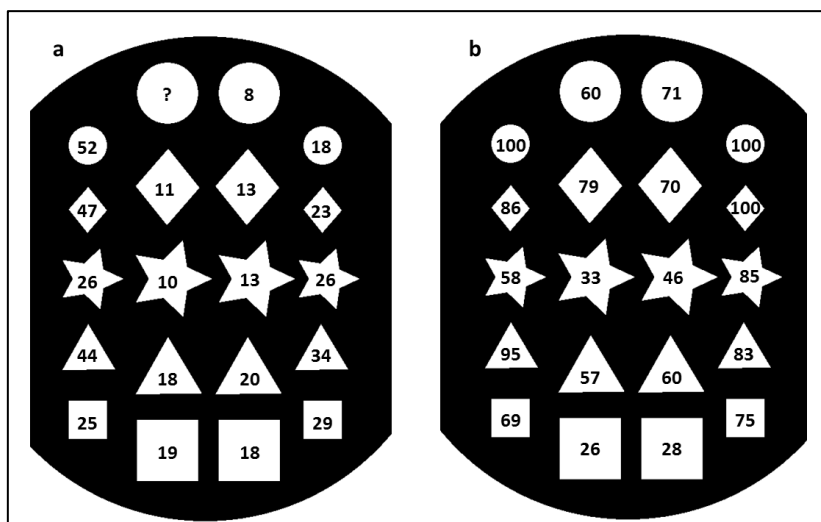


Figure 104 : Schémas des échantillons sur lesquels sont reportées les valeurs de τ_c (en %) calculées à 7 jours (a) et à 14 jours (b), pour la première série de cultures, à partir des micrographies effectuées en lumière naturelle

En première approche, quelle que soit la durée de culture des cellules sur les substrats, le taux de remplissage des macropores de petite taille ne semble pas être fortement impacté par la géométrie des pores (Figure 104). Concernant les macropores de plus grande dimension, leur colonisation par les cellules semble dépendre de la géométrie de ces derniers. Après 7 jours suivant l'ensemencement, les cellules semblent proliférer préférentiellement au sein des macropores de géométrie carrée ou triangulaire ($\tau_c = 19 \pm 1$ %) que dans les pores de géométries étoile, cercle, et losange ($\tau_c \leq 13$ %) (Figure 104-a). En revanche, après 14 jours suivant l'ensemencement, les taux de remplissage les plus élevés, de l'ordre de 65 ± 10 %, sont atteints pour les géométries du type cercle, losange et triangle (Figure 104-b). Le remplissage des pores de géométrie étoile a également augmenté entre 7 jours et 14 jours mais les valeurs de τ_c atteintes sont moins importantes que dans le cas du cercle, du losange et du triangle. Enfin, les macropores de géométrie carrée apparaissent comme les moins colonisés après 14 jours ($\tau_c = 27 \pm 1$ %). Ce résultat peut être expliqué par la surface S_0 plus élevée des pores carrés qui offre donc une surface colonisable plus importante. Le taux de recouvrement τ_c semble donc être impacté également par les caractéristiques dimensionnelles des macropores.

Les valeurs de taux de recouvrement τ_c sont reportées en fonction du périmètre P des domaines définis par les sections horizontales des macropores (Figure 105), de leur surface S_0 (Figure 106) et du diamètre D_i du cercle inscrit dans ces géométries (Figure 107).

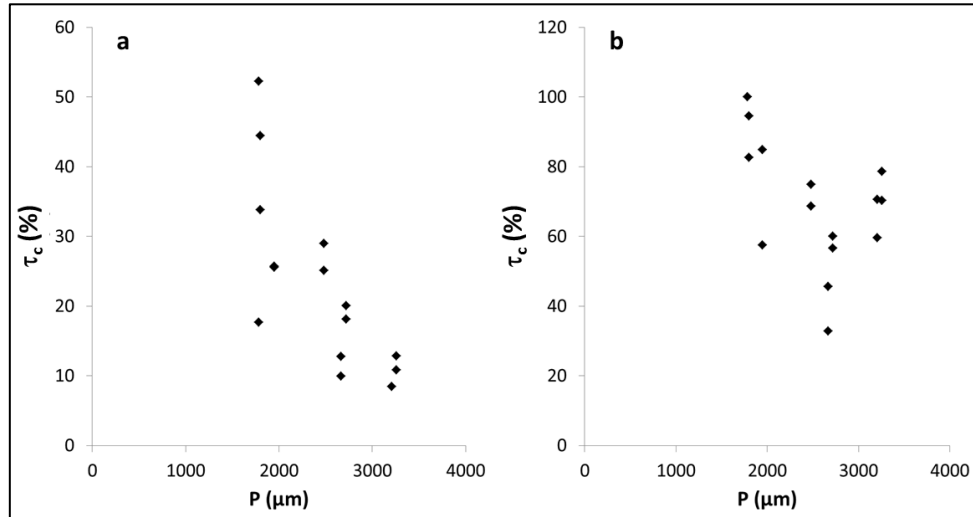


Figure 105 : Valeurs des taux de recouvrement τ_c , après 7 jours (a) et 14 jours (b) de culture, en fonction des valeurs de périmètre P des sections des pores déterminées à partir des micrographies

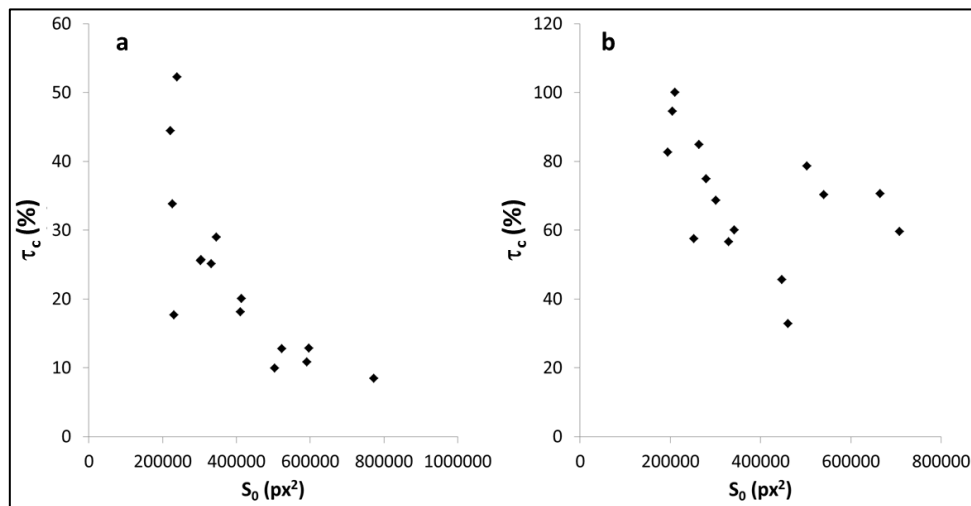


Figure 106 : Valeurs des taux de recouvrement τ_c , après 7 jours (a) et 14 jours (b) de culture, en fonction des valeurs de surface S_0 des sections des pores déterminées à partir des micrographies

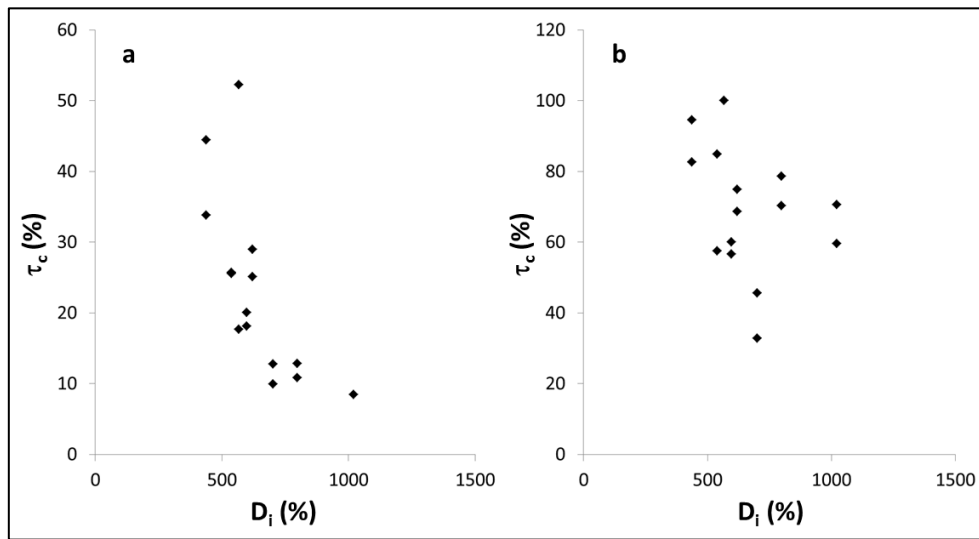


Figure 107 : Valeurs des taux de recouvrement τ_c , après 7 jours (a) et 14 jours (b) de culture, en fonction du diamètre D_i des cercles inscrits dans les pores déterminé à partir des micrographies

Après 7 jours d'ensemencement, le taux de recouvrement τ_c diminue avec le périmètre P de la section des pores (Figure 105-a), avec la surface S_0 de cette section (Figure 106-a) et avec le diamètre D_i des cercles inscrits dans ces géométries (Figure 107-a). Ces paramètres dimensionnels ont donc chacun un impact sur la colonisation cellulaire à l'intérieur des pores. Cependant, les effets de ces paramètres respectifs sur la comportement cellulaire peuvent difficilement être traités séparément. Les valeurs de τ_c sont également reportées en fonction des rapports P/S_0 des pores (Figure 108-a).

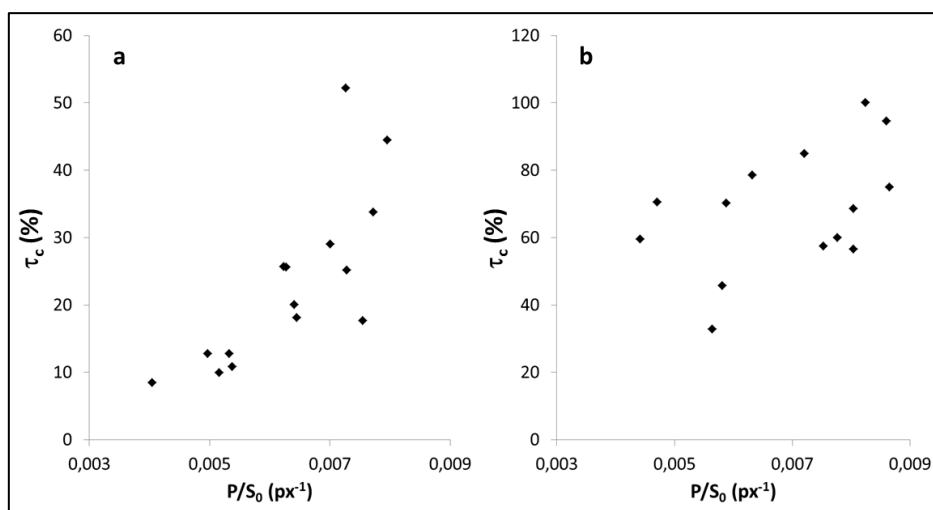


Figure 108 : Valeurs des taux de recouvrement τ_c , après 7 jours (a) et 14 jours (b) de culture, en fonction du rapport des valeurs de périmètre P et de surface S_0 de section des pores, déterminées à partir des micrographies

Après 7 jours d'ensemencement, le taux de recouvrement τ_c augmente avec le rapport P/S_0 . La colonisation cellulaire à l'intérieur des pores semble pouvoir être favorisée en maximisant le périmètre P de la section des macropores pour une surface de section fixée. Ces constations permettent donc d'orienter les choix vers des géométries maximisant l'interface matériau/cellules.

Toutefois, le choix des géométries ne peut pas se limiter aux paramètres dimensionnels P , S_0 et D_i . L'observation détaillée des micrographies permet de noter un autre phénomène lié à la géométrie des macropores. Les micrographies reportées en Figure 109 et Figure 110, représentatives des observations effectuées sur la totalité des macropores de tous les échantillons, permettent de localiser les zones colonisées prioritairement par les cellules au sein des macropores.

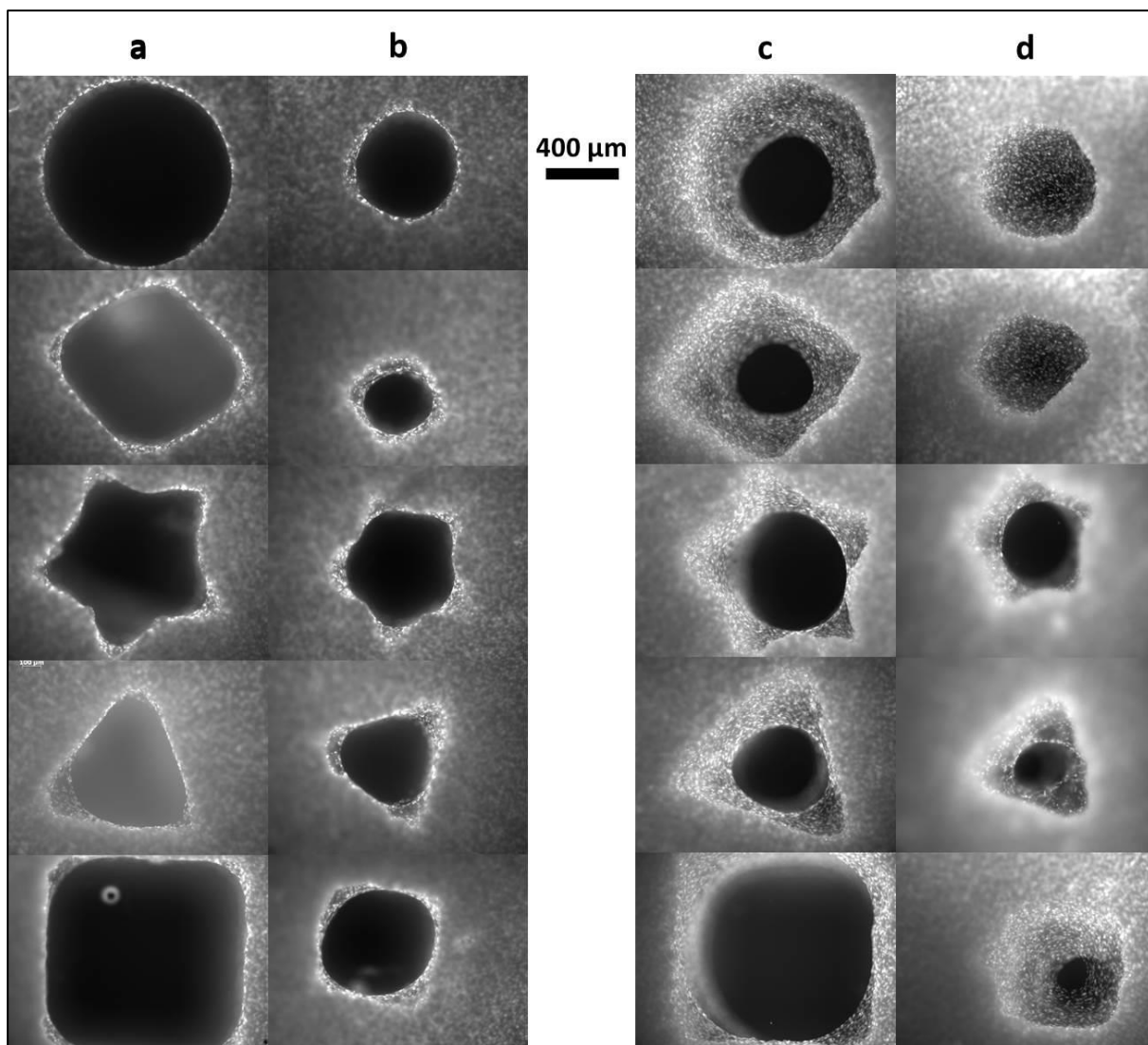


Figure 109 : Micrographies par immunofluorescence des substrats SiHA, effectuées avec un filtre adapté au marqueur d'ADN (Hoechst 33342), des pores de grande dimension (a) et de petite dimension (b), après 7 jours d'ensemencement des cellules MC3T3, puis des pores de grande dimension (c) et de petite dimension (d) après 14 jours d'ensemencement (Grossissement : 10 ×)

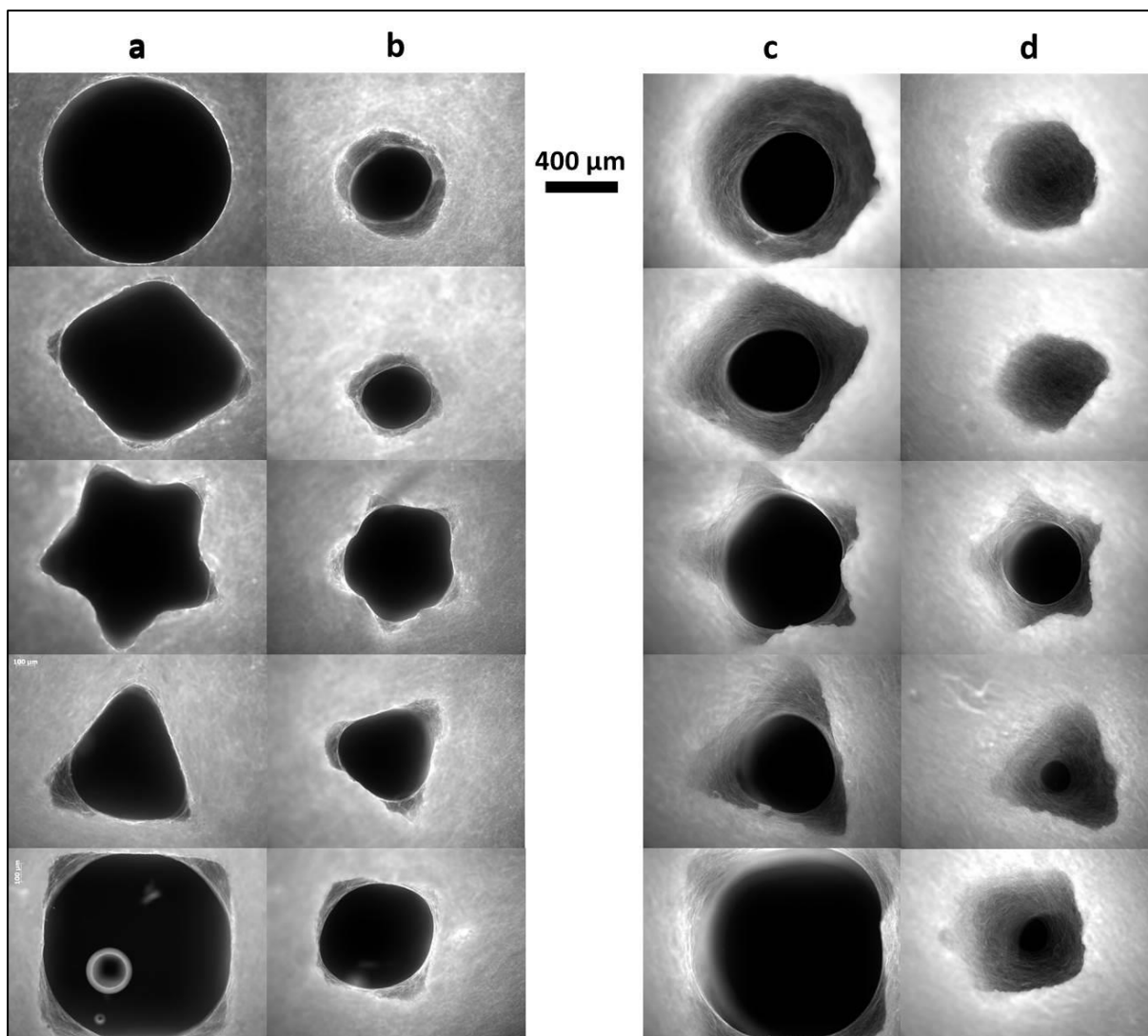


Figure 110 : Micrographies par immunofluorescence des substrats SiHA, effectuées avec un filtre adapté au marqueur d'actine (dylight 488 conjugué à la phalloïdine), des pores de grande dimension (a) et de petite dimension (b), après 7 jours d'ensemencement des cellules MC3T3, puis des pores de grande dimension (c) et de petite dimension (d) après 14 jours d'ensemencement (Grossissement : 10 ×)

Après 7 jours (Figure 109-a, Figure 109-b, Figure 110-a et Figure 110-b), dans le cas des macropores à section circulaire, les cellules sont réparties de façon homogène sur les contours des macropores. En revanche, dans le cas des géométries anguleuses, les cellules recouvrent préférentiellement l'intérieur des angles. Ces observations sont en accord avec les résultats de l'étude réalisée par Rumpler *et al.* [123] où la formation de tissu (cellules entourées de matrice extracellulaire collagénique) a débuté préférentiellement dans les angles des canaux à section polygonale alors que ce même tissu recouvrait uniformément la surface

interne des canaux à section circulaire. De plus, suite au comblement des angles par les cellules, conduisant à l'arrondissement de ceux-ci et donc à une modification locale de la courbure, la colonisation semble être ralentie par la présence de bords plans. Ce phénomène est visible en particulier sur les macropores de géométrie carrée (Figure 110). La colonisation semble également être ralentie voire stoppée par la présence de bords convexes. Ce phénomène est détectable dans le cas des macropores en forme d'étoile. Le phénomène de colonisation des macropores semble donc favorisé par la présence d'angles saillants et défavorisé par la présence d'angles rentrants. Ce phénomène peut être lié à un contact cellule/cellule, évoqué au paragraphe I.4.2.4 [128], plus important à l'intérieur des angles, favorisant les interactions entre cellules voisines et ainsi la colonisation par des cellules et la formation d'architectures cellulaires tridimensionnelles. De plus, les tensions créées entre cellules voisines au sein des angles pourraient engendrer des tensions de surface du tissu cellulaire formé qui tendraient naturellement à se minimiser comme dans tout système physicochimique. Mais l'hypothèse purement physique de minimisation de l'énergie de surface par la minimisation de la surface est difficile à transposer à un système biologique complexe et ne suffit pas à elle seule à expliquer le phénomène biologique observé ici. La compréhension de ce phénomène de colonisation passe par donc par une étude de mécanique cellulaire approfondie. Les résultats présentés ici sont cohérents avec l'hypothèse, évoquée au paragraphe I.4.2.4, selon laquelle certaines architectures de substrats pourraient constituer des zone d'adhérences spécifiques (ou des points d'accroche) pour les cellules et ainsi induire une modification de leur morphologie, susceptible d'influencer leur comportement. En particulier, des structures fibreuses avaient provoqué une elongation des cellules lors de l'étude menée par Kumar *et al.* [122]. Selon Bidan *et al.* [124], des tensions pourraient être générées au sein des fibres d'actine entre des points d'adhésion situés de part et d'autre d'une concavité. Dans le cas présent, contrairement à une orientation aléatoire des fibres d'actine sur le dessus des pastilles en dehors des macropores, l'observation des fibres d'actine des cellules situées à l'interface fluide-cellules suggère un alignement parallèle de ces fibres avec cette interface (Figure 110). Ces observations sont également en accord avec celles de Rumpler *et al.* [123]. Cette orientation préférentielle des fibres d'actines suggère un mécanisme dans lequel des forces mécaniques pourraient se développer au sein des tissus constitués des cellules situées principalement dans les régions de forte courbure, c'est à dire dans les angles. Les forces mécaniques suggérées ici pourraient alors intervenir dans la stimulation de l'activité cellulaire. En outre, l'observation des macropores en forme de losange permet de supposer une prolifération ou une migration plus rapide dans le cas des plus petits angles. En effet,

suite à 7 jours d'ensemencement, un remplissage plus important des angles de 80° que des angles de 100° , au sein des losanges, est constaté visuellement sur les micrographies (Figure 109-a Figure 110-a). Les cellules semblent donc migrer, adhérer et/ou proliférer prioritairement dans les concavités des macropores, liées aux angles aigus. Ces résultats sont également en accord avec ceux de l'étude réalisée par Rumpler *et al.* [123] où l'épaisseur du tissu formé était plus importante dans les angles des canaux à section triangulaire, suivie de ceux à section carrée, puis hexagonale, suggérant que la formation de tissu s'amplifie avec la décroissance de la courbure locale.

Le taux de recouvrement τ_c , défini par l'Équation 17, est le paramètre généralement utilisé dans la littérature pour quantifier la colonisation cellulaire. Le calcul de ce paramètre implique une normalisation des résultats par rapport à un unique paramètre dimensionnel, la surface initiale des pores S_0 . Le taux de recouvrement τ_c n'est pas forcément le seul paramètre pertinent permettant la description du phénomène de colonisation. Afin de s'affranchir du choix catégorique d'un paramètre dimensionnel de référence, il peut être intéressant d'étudier directement la surface A recouverte par les cellules en fonction des différents paramètres dimensionnels des pores. Les résultats, obtenus après 7 jours d'ensemencement sont présentés en Figure 111.

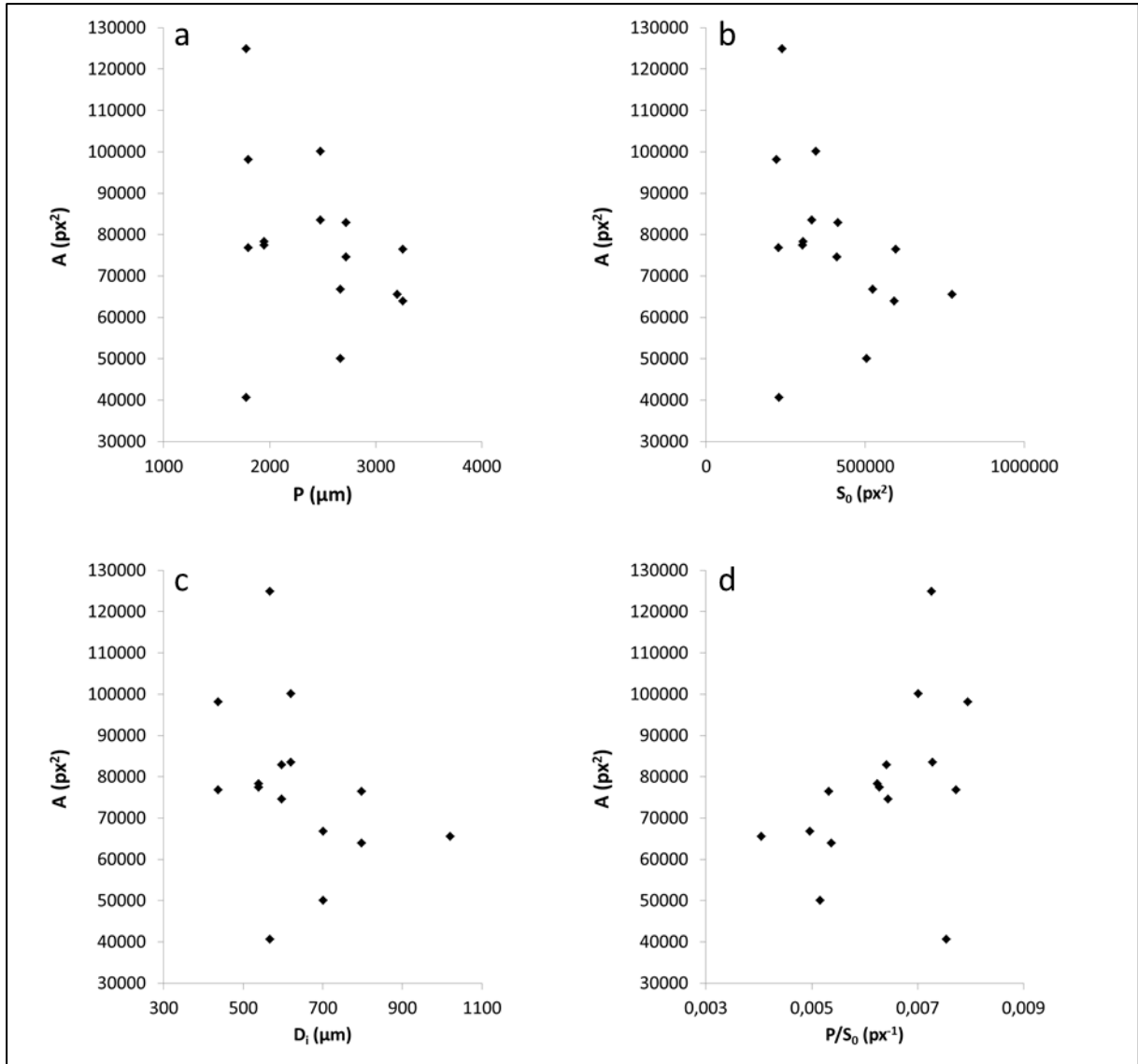


Figure 111 : Valeurs des surfaces A recouvertes par les cellules, après 7 jours de culture, en fonction du périmètre P (a), de la surface S_0 (b), du diamètre D_i du cercle inscrit (c), et du rapport P/S_0 (d) des sections des pores

Les évolutions de la surface A recouverte par les cellules en fonction des différents paramètres dimensionnels des pores sont similaires à celles du taux de recouvrement τ_c . Cependant, elles apparaissent moins marquées, ce qui conduit à supposer une influence plus importante des angles, à 7 jours, que des paramètres dimensionnels P , S_0 et D_i . Néanmoins, la Figure 111-d confirme une augmentation de la surface A recouverte par les cellules avec le rapport P/S_0 .

La colonisation cellulaire préférentielle au sein des angles saillants peut conduire à envisager des macropores à section polygone régulier convexe d'ordre élevé, c'est-à-dire avec

de nombreux angles. (Le terme « convexe » utilisé ici sert uniquement à définir un type d'objet en géométrie plane et ne signifie pas la présence de convexité à l'intérieur de ces géométries). Cependant, le fait d'augmenter le nombre d'angles au sein d'un polygone régulier convexe conduit à augmenter la valeur des angles, ce qui est en contradiction avec le souhait d'incorporer de petits angles dans ces géométries. De plus, une augmentation du nombre d'angles du polygone régulier convexe conduit à une augmentation de la valeur de l'apothème (ou rayon du cercle inscrit), notée a , du polygone et donc de la valeur du diamètre D_i du cercle inscrit. Or, selon la Figure 107, le taux de recouvrement τ_c diminue avec l'augmentation de la valeur de D_i . Enfin, l'apothème étant liée aux paramètres P et S_0 par l'Équation 18, une augmentation de la valeur de l'apothème conduit à une diminution du rapport P/S_0 , et donc à une diminution du taux de recouvrement τ_c et de la surface recouverte A (Figure 108-a et Figure 111-d). Les géométries à section polygone régulier convexe ne semblent donc pas constituer des sièges favorables à la colonisation cellulaire. Ces résultats conduisent donc à envisager des géométries plus complexes constituées de lignes brisées et donc à développer des objets fractals à partir de polygones. Par exemple, dans le cas du triangle équilatéral, chaque côté peut être divisé en trois segments de longueur égale (Figure 112-a). Chaque segment médian ainsi obtenu peut constituer la base d'un nouveau triangle équilatéral (Figure 112-b) ; les segments médians sont ensuite supprimés (Figure 112-c). La réitération de ces étapes conduit à la formation d'un objet fractal appelé « flocon de Koch » (Figure 112-c, d, e). Pour un triangle initial de périmètre P_F , le périmètre du flocon après n itérations vaut $P_F \times (4/3)^n$ et son aire tend vers une valeur finie. La valeur du périmètre peut ainsi être infiniment étendue alors que celle de la surface est limitée, ce qui permet une maximisation du rapport P/S_0 .

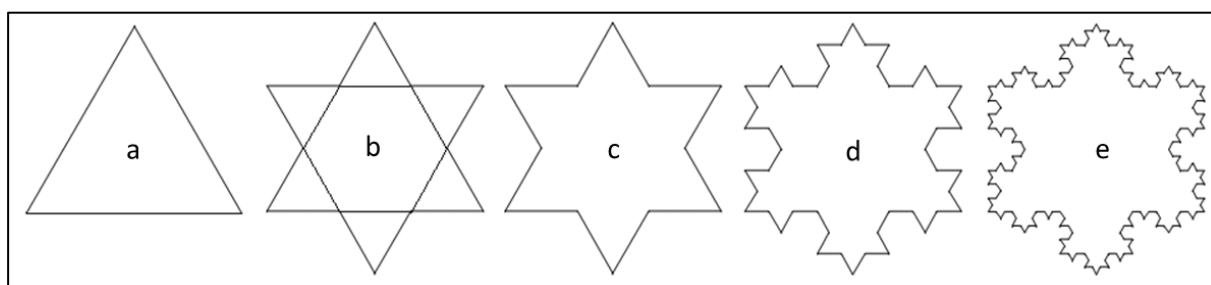


Figure 112 : Etapes de formation d'un flocon de Koch : triangle équilatéral initial (a), segmentation des côtés et formation des nouveaux triangles équilatéraux (b), suppression de la base des nouveaux triangles et obtention du flocon de première itération (c), flocons après 2 itérations (d), flocon après 3 itérations (e)

La présence de lignes brisées faisant intervenir des angles rentrants, le choix des géométries pourrait donc résider dans un bon compromis de maximisation du rapport P/S_0 et de minimisation des angles rentrants.

$$a = \frac{2 \times S_0}{P}$$

Équation 18 : Relation reliant l'apothème a d'un polygone régulier convexe à sa surface S_0 et son périmètre P

Après 14 jours suivant l'ensemencement (Figure 109-c et d et Figure 110-c et d), les cellules semblent avoir comblé la totalité des concavités des macropores, quelles que soient leurs dimensions. La modification locale de courbure engendrée par la colonisation des angles par les cellules conduit à l'obtention de canaux circulaires quelle que soit la géométrie de la section initiale des macropores. La formation d'un cercle de cellules est en effet constatée au centre de chaque macropore et ce cercle progresse vers l'intérieur afin de le combler comme dans tout processus de comblement de lacune. Il est possible que les cellules présentes sur les bords plans ou convexes des macropores soient stimulées mécaniquement par le réseau de cellules provenant des zones anguleuses, ce qui provoquerait leur prolifération. Il s'agirait donc ici d'un mécanisme d'auto-organisation cellulaire où les effets de concavités et d'interface matériau-cellule ne sembleraient plus intervenir après 14 jours d'ensemencement. Aucune tendance n'est observée concernant l'évolution du taux de recouvrement τ_c avec les paramètres dimensionnels P , S_0 , et D_i , après 14 jours d'ensemencement (Figure 105-b, Figure 106-b, Figure 107-b, Figure 108-b). Les paramètres dimensionnels P , S_0 , et D_i n'interviennent donc plus directement sur la colonisation cellulaire.

III.5.3 Conclusions

Cette étude a permis de mettre en évidence deux étapes distinctes lors de la colonisation des macropores par les cellules.

Dans un premier temps, la colonisation cellulaire est fortement influencée par les paramètres dimensionnels et géométriques des macropores. La colonisation des macropores par les cellules peut être favorisée en augmentant la surface d'interaction entre le matériau et

les cellules. En particulier, il a été montré que le taux de recouvrement des macropores augmentait avec le rapport du périmètre de la section horizontale des macropores sur la surface de cette section. De plus, la colonisation des macropores par les cellules semble être favorisée, à court terme, par la présence de concavités dans la géométrie des macropores et défavorisée par la présence de convexités. En particulier, les cellules semblent coloniser rapidement des zones anguleuses (angles saillants) et ce phénomène est plus marqué avec la diminution de la valeur de l'angle. Ces résultats sont en accord avec les conclusions des études récentes réalisées par Rumpler *et al.* et Bidan *et al.* [123,124,129].

A plus long terme, lorsque les concavités des macropores sont totalement remplies par les cellules, ces dernières forment alors un cercle inscrit dans la géométrie de la section horizontale du macropore. Une fois cette étape franchie, les paramètres dimensionnels et géométriques des macropores n'interviennent plus dans le processus de colonisation cellulaire. Il n'y a plus d'effet direct du substrat sur le comportement cellulaire. Le cercle formé par les cellules progresse vers l'intérieur du macropore de la même façon quelle que soit la géométrie de la section de ce dernier. La colonisation cellulaire est alors fortement influencée par les interactions inter-cellules, il s'agit là d'un effet biologique principalement. L'éventuelle influence du substrat sur le comportement cellulaire est alors due à ses propriétés de dégradation. Il s'agit d'un effet indirect qui n'est pas lié à l'architecture macroporeuse.

De plus, les résultats issus de cette étude conduisent à envisager des géométries de macropores complexes, constituées de lignes brisées, et résultant d'un bon compromis de maximisation du rapport P/S_0 et de minimisation des angles rentrants. Cependant, les conclusions tirées de cette étude préliminaire en deux dimensions ne suffisent pas à définir les géométries tridimensionnelles les plus favorables à la colonisation cellulaire des macropores. Ces travaux devront être complétés par une autre étude visant à déterminer la répartition des cellules à différents niveaux de profondeur des macropores, par microscopie confocale. Un dernier paramètre dimensionnel, la hauteur H , pourra alors être pris en compte, ce qui permettra d'évaluer l'effet de la surface de la paroi ($S_P = P \times H$) et du volume du macropore ($V = S_0 \times H$), sur la colonisation cellulaire du macropore.

III.6 Etude préliminaire de l'effet de la géométrie des macropores sur la vascularisation

Un protocole d'implantation et d'extraction d'implants poreux en céramique sur la membrane chorio-allantoïdienne (CAM) d'embryons de poulet a été mis en place afin d'étudier la vascularisation au sein de macropores de différentes géométries.

III.6.1 Préparation des implants

Les implants sont élaborés dans les mêmes conditions que ceux utilisés dans le paragraphe III.5. Les masques des deux configurations étudiées sont présentés en Figure 113. Pour chaque implant, toutes les couches sont réalisées avec un masque identique. Comme précédemment, les implants sont des disques composés de macropores totalement traversants et perpendiculaires à la surface des disques, permettant ainsi le passage des vaisseaux. Plusieurs épaisseurs d'implants sont testées.

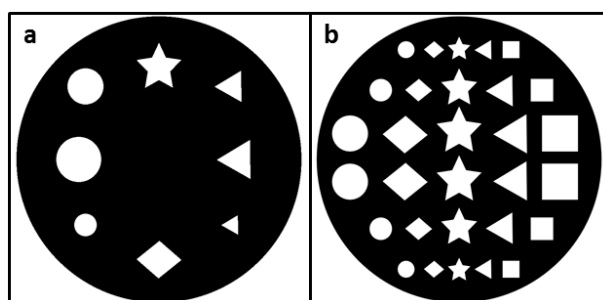


Figure 113 : Masques utilisés pour la mise en forme des implants pour les tests ex-vivo : configuration A (a) et configuration B (b)

Les masses des implants frittés sont déterminées à l'aide d'une balance de précision 10^{-1} g. Les implants sont stérilisés à l'autoclave pendant 1 h à 200°C , avant utilisation.

III.6.2 Préparation des œufs

Après 5 jours de stockage en salle de culture, à température comprise entre 16°C et 17°C , une croix est effectuée sur le dessus de l'œuf pour le repérage de l'embryon (Figure 114-a). Les œufs sont placés dans un incubateur, embryon vers le haut, à $37,7^{\circ}\text{C}$ et 52 % d'hygrométrie. Ce temps initial est appelé jour embryonnaire zero et est noté E0. Les œufs

sont ensuite ouverts à E2,5. Un trou est effectué au niveau de la pointe de l'œuf à l'aide de ciseaux (Figure 114-b). 10 mL d'albumine sont prélevés à la seringue (Figure 114-c). Une incision est pratiquée au scalpel, au centre de l'œuf, à l'opposé de l'embryon (Figure 114-d). Cette incision est élargie de façon à créer une longue fente perpendiculaire à l'œuf, permettant son ouverture (Figure 114-e). Le contenu de l'œuf est déposé dans une nacelle préalablement stérilisée (Figure 114-f). Les éventuelles bulles d'air sont éliminées à la seringue (Figure 114-g). La nacelle est ensuite déposée dans une boîte de pétri stérile dont le fond est recouvert d'eau distillée stérile préalablement portée à 40°C. Enfin, la boîte de pétri est refermée et placée à l'incubateur à 37,7°C et 52 % d'hygrométrie (Figure 114-h).

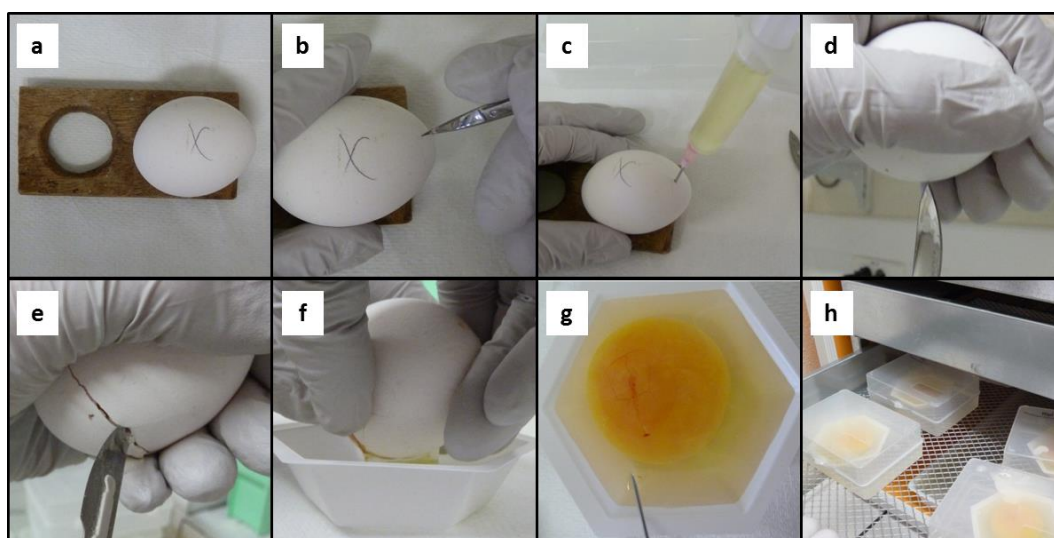


Figure 114 : Préparation des œufs : repérage de l'embryon (a), perçage (b), retrait du surplus d'albumine (c), incision (d), ouverture (e), dépôt du contenu (f), retrait des bulles d'air (g), mise en incubateur (h)

III.6.3 Greffe

L'embryon est sorti de l'incubateur au jour embryonnaire choisi. Deux temps sont testés : E5,5 et E8,5. L'implant est déposé sur une zone contenant un sinus veineux, avec des pinces préalablement nettoyées à l'éthanol (Figure 115). Aucun autre produit n'est utilisé pour le nettoyage des ustensiles afin d'éviter toute contamination, la membrane chorio-allantoïdienne (CAM) étant très poreuse. L'embryon greffé est ensuite replacé à l'incubateur à 37,7°C et 52 % d'hygrométrie.

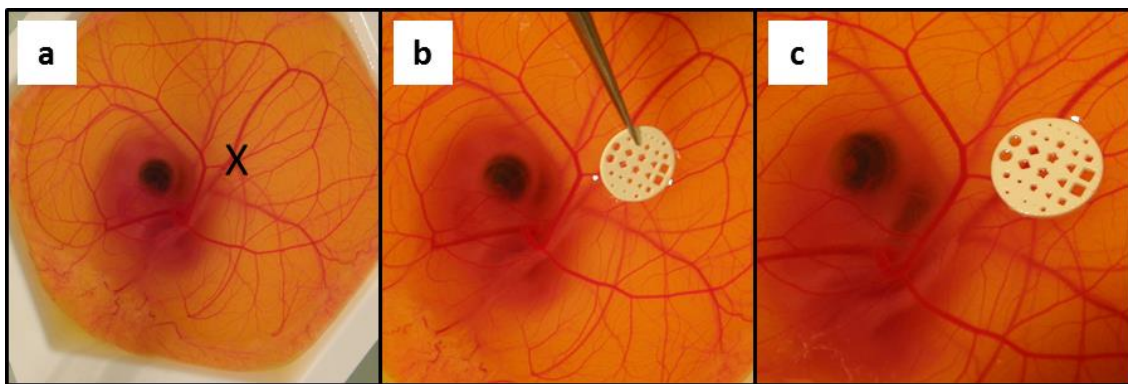


Figure 115 : Greffe : repérage d'un sinus veineux (signalé sur l'image par une croix) (a), positionnement de l'implant (b), dépôt de l'implant sur la membrane (c)

III.6.4 Extraction et analyse des implants

Les implants sont retirés après 4 jours, soit à E9,5 et E12,5 respectivement, suite à l'euthanasie des embryons. L'implant est soulevé à l'aide de pinces et la CAM qui l'entoure est coupée avec des ciseaux (Figure 116-a). L'implant entouré de CAM est plongé dans un puits de culture contenant du formol (Figure 116-a). Les puits de culture contenant les implants formolés sont ensuite placés au réfrigérateur pour une nuit, puis sont rincés au PBS avant d'être congelés à -20°C.

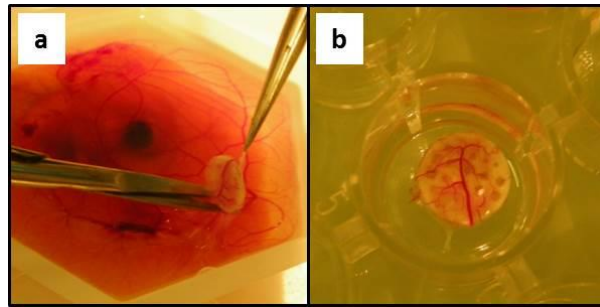


Figure 116 : Extraction d'un implant (a) et immersion dans le formol (b)

Suite à leur extraction, les faces inférieures (en contact avec la CAM) et supérieure des implants sont observées à la loupe binoculaire afin de localiser les « chemins » empruntés par les vaisseaux, lors de leur développement, pour traverser les implants.

III.6.5 Résultats

III.6.5.1 Caractérisation des implants

Les substrats étant mis en forme et frittés dans les mêmes conditions que les échantillons présentés dans le chapitre II, les résultats d'analyses de phases et de mesures de taux de microporosité ouverte sont considérés comme identiques.

Les masses des implants frittés sont indiquées dans le Tableau 34.

	Configuration A	Configuration B
Nombre de couches	Masse (mg)	Masse (mg)
1	32,8	25,5
2	71,8	57,7
5	142,6	139,6

Tableau 34 : Masse des implants frittés pour l'étude ex-vivo

III.6.5.2 Résultats des tests *ex vivo*

Les greffes effectuées à E5,5 conduisent à l'immersion des implants dans le jaune de l'œuf (Figure 117). Deux explications peuvent être fournies pour justifier ce phénomène. Le développement de la membrane chorio-allantoïdienne (CAM) s'effectue entre E4,5 et E6,5. Par conséquent, à E5,5, la membrane peut être encore trop fragile pour soutenir les implants en surface du jaune. Si la membrane se révèle suffisamment épaisse pour maintenir l'implant en surface à E5,5, le développement de cette dernière peut provoquer un déplacement de l'implant vers le bord de la nacelle et le basculement de celui-ci derrière le jaune. En revanche, dans le cas des greffes réalisées à E8,5, tous les implants sont maintenus en surface du jaune jusqu'à leur extraction, quelle que soit leur masse.

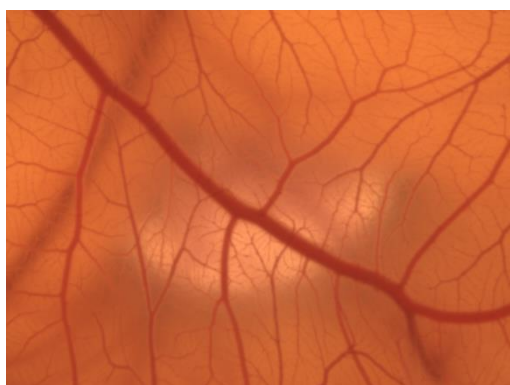


Figure 117 : Photographie d'un implant immergé dans le jaune de l'œuf

La Figure 118 présente les photographies de certains implants vus de dessous (face inférieure), suite à leur extraction. Il s'agit donc de l'observation de la face de l'implant précédemment en contact avec la CAM.

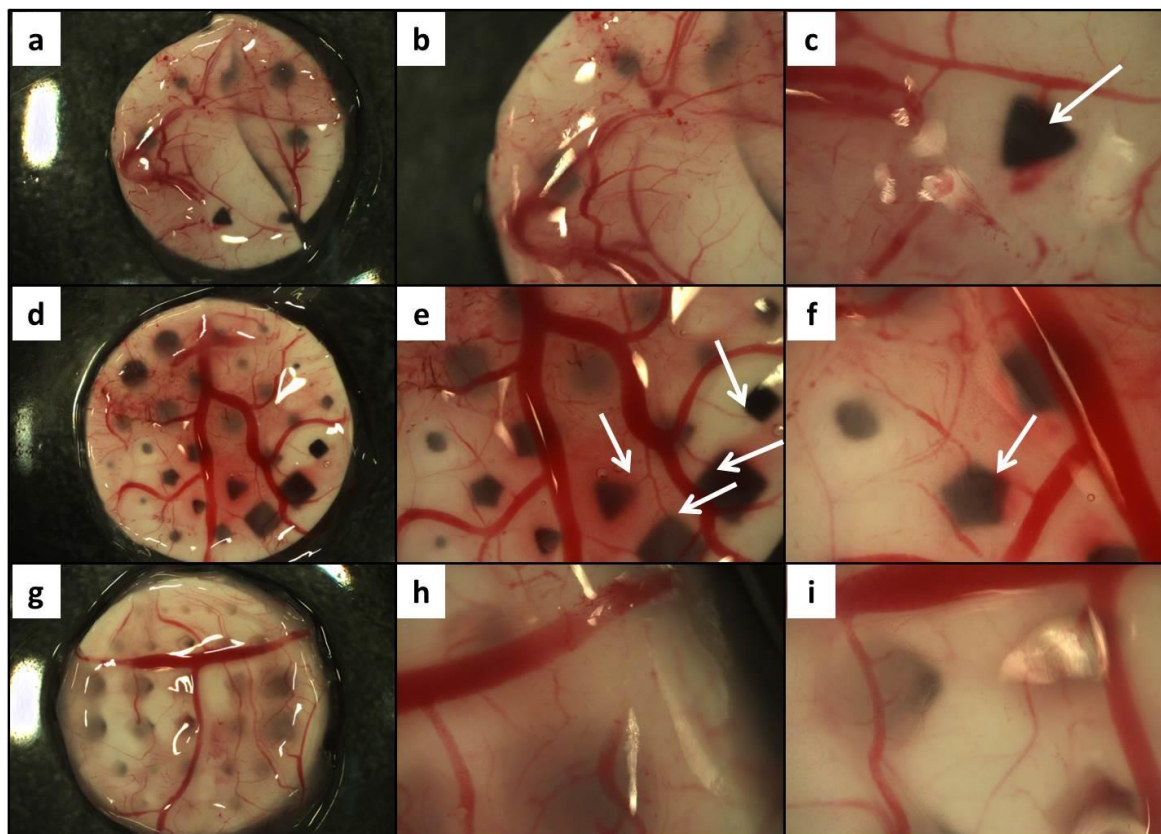


Figure 118 : Photographies des implants à E12,5 après leur extraction (face inférieure) : configuration A – 1 couche (a, b, c), configuration B – 2 couches (d, e, f), configuration B – 5 couches (g, h, i)

L'observation des implants de configuration A met en évidence une absence de vaisseau sur la région centrale des implants ne contenant aucun macropore (Figure 118-a). En effet, les vaisseaux semblent se développer préférentiellement sur les zones parsemées de macropores. Au contraire, le développement des vaisseaux semble se faire de façon plus homogène à la surface des implants de configuration B (Figure 118-d). Les macropores semblent donc constituer des points d'accroche ou des lieux de passage favorables pour les vaisseaux en développement. L'observation à plus fort grossissement (Figure 118-b, c, e, f, h, i), des faces inférieures des implants, suite à leur extraction, permet de visualiser de petits vaisseaux en développement semblant s'orienter en direction des macropores.

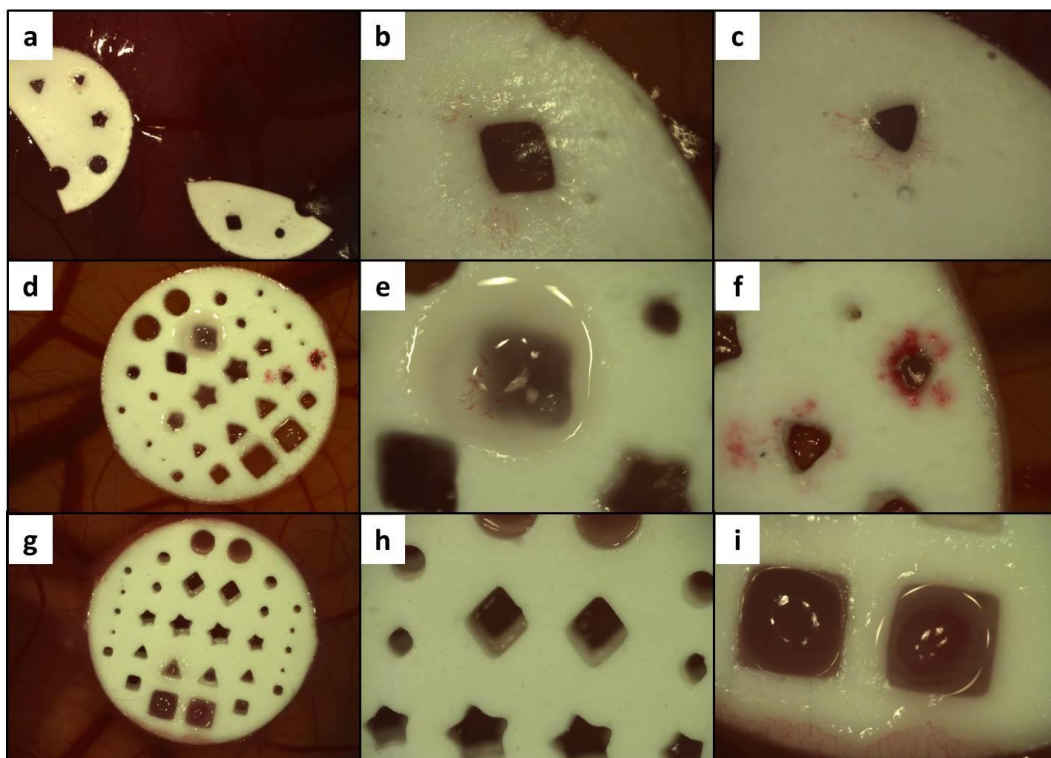


Figure 119 : Photographies des implants à E12,5 avant leur extraction : configuration A – 1 couche (a, b, c), configuration B – 2 couches (d, e, f), configuration B – 5 couches (g, h, i)

L'observation de la face supérieure d'implants de différentes épaisseurs, avant extraction, permet plusieurs constatations (Figure 119). De fins vaisseaux font leur apparition en surface des implants d'une ou deux couche(s) au niveau des contours des macropores (Figure 119-b, c, e). En revanche, aucun vaisseau n'est détectable en surface des échantillons constitués de 5 couches (Figure 119-h). Les vaisseaux semblent donc être en mesure de traverser des macropores de hauteur inférieure ou égale à 400 μm mais pas des macropores de hauteur 1 mm, pour le temps d'implantation étudié.

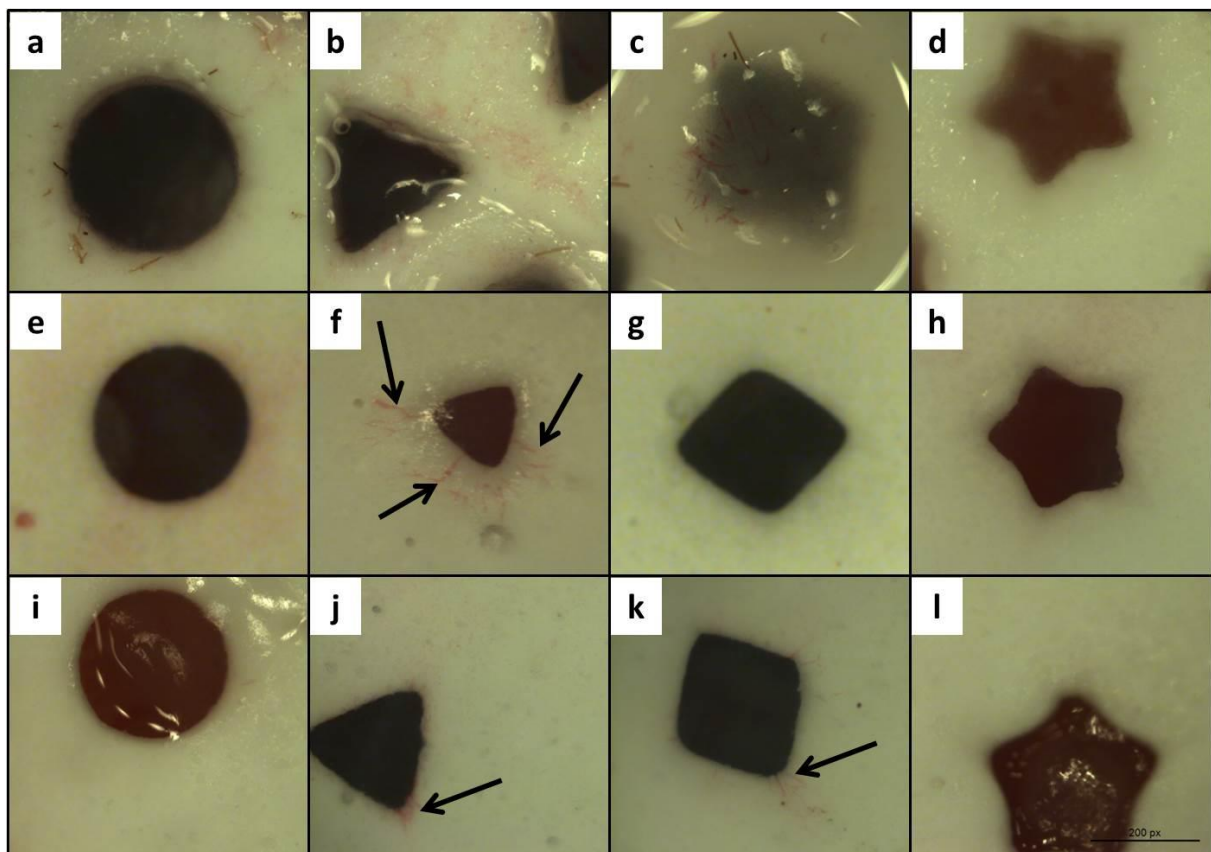


Figure 120 : Photographies des implants (face supérieure) à E12,5 : implant de configuration B – 2 couches (a, b, c, d), implant de configuration A – 1 couche (e, f, g, h), implant de configuration A – 1 couche (i, j, k, l)

Enfin, l'observation des différentes géométries, au sein d'un même implant d'une couche, sur cette face supérieure, permet une constatation supplémentaire (Figure 120). Aucun vaisseau n'est détecté sur la face supérieure des implants, à proximité des géométries de type cercle ou étoile (Figure 120-a, d, e, h, i, l). Les vaisseaux apparaissant sur la surface supérieure des implants sont localisés sur les contours des géométries de type triangle ou losange (Figure 120-c, f, j, k). Enfin, il semblerait que ces vaisseaux, sur certains macropores, soient répartis principalement au niveau des angles de ces géométries (Figure 120- j et k).

III.6.6 Conclusions de l'étude *ex vivo*

Un protocole d'implantation et d'extraction de disques poreux en céramique sur la membrane chorio-allantoïdienne (CAM) d'embryons de poulet a été mis en place. Lors de cette étude, l'implant a pu être maintenu en surface de la membrane et le passage de vaisseaux à l'intérieur de macropores prismatiques verticaux a été observé.

Cette étude a également permis de mettre en évidence la présence de vaisseaux sur les zones contenant des macropores et l'absence de ceux-ci sur les zones n'en contenant pas. Ces résultats préliminaires suggèrent que de tels macropores pourraient constituer des points d'accroche ou des lieux de passage favorables pour les vaisseaux en développement. De plus, les premières observations témoignent d'un passage de vaisseaux dans les macropores prismatiques de section horizontale de type triangle ou losange et non dans les macropores cylindriques. Enfin, les vaisseaux traversant semblent se localiser préférentiellement au niveau des angles de ces géométries.

Les constatations effectuées lors de cette étude ne peuvent donner lieu à des conclusions sur le développement vasculaire. Néanmoins, les premières observations sont encourageantes pour de futures utilisations de cette méthode d'évaluation de la vascularisation au sein d'implants poreux. Une quantification des vaisseaux présents sur la face supérieure des implants est envisagée par traitement d'image. Le caractère traversant de ces vaisseaux pourra être vérifié par microtomographie à rayons X. Enfin, ces techniques d'observation pourront être complétées par des analyses histologiques afin d'accéder à des paramètres quantitatifs supplémentaires.

III.7 Conclusion du chapitre III

Suite à l'adsorption d'insuline à la surface d'HA et SiHA, la présence de la protéine à la surface du matériau a pu être vérifiée par spectroscopie IRTF. L'analyse des spectres a permis également de suggérer une modification de la conformation de l'insuline lors de son adsorption. Cette hypothèse a pu être confirmée par dichroïsme circulaire. Les résultats obtenus par les deux méthodes spectroscopiques sont en accord et suggèrent que le processus d'adsorption de l'insuline sur les surfaces d'HA et SiHA tend à modifier la structure secondaire de la protéine d'une majorité d'hélices- α à une conformation de type feuillet- β .

L'étude de biocompatibilité réalisée *in vitro* sur SiHA a montré que l'incorporation du silicium dans l'hydroxyapatite ne modifiait pas la viabilité cellulaire. Toutefois, l'insuline adsorbée à la surface de SiHA semblait avoir un effet positif sur les contacts focaux des cellules et sur l'activité de la protéine RhoA.

L'étude *in vivo* a révélé, après 9 semaines d'implantation en site sous-cutané, une réponse inflammatoire légèrement plus élevée pour SiHA que dans le cas d'HA. Aucune influence significative de l'insuline adsorbée sur la réponse inflammatoire de HA et SiHA n'a pu être observée.

L'ensemencement de cellules préostéoblastes sur des substrats de SiHA contenant différentes géométries de macropores a permis de mettre en évidence deux étapes distinctes lors de la colonisation, *in vitro*, des macropores par les cellules. La première étape, guidée par les interactions entre le matériau et les cellules consiste au comblement des concavités des macropores par les cellules. Ce phénomène de colonisation cellulaire semble être fortement influencé par les paramètres dimensionnels et géométriques des macropores. En particulier, le taux de recouvrement des macropores augmente avec le rapport du périmètre de la section horizontale des macropores sur la surface de cette section. Lorsque les concavités des macropores sont totalement remplies par les cellules, ces dernières forment un cercle inscrit dans la géométrie de la section horizontale du macropore. Une deuxième étape de colonisation est alors entamée, lors de laquelle les paramètres dimensionnels et géométriques des macropores ne semblent plus intervenir. Les résultats issus de cette étude conduisent à envisager des géométries de macropores complexes, constituées de lignes brisées, et résultant

d'un bon compromis de maximisation du rapport P/S_0 et de minimisation des angles rentrants. Ces travaux seront prochainement complétés au laboratoire par une autre étude visant à déterminer la répartition des cellules à différents niveaux de profondeur des macropores.

Un protocole d'implantation et d'extraction de disques poreux en céramique sur la membrane chorio-allantoïdienne (CAM) d'embryons de poulet a pu être mis en place, afin d'étudier le développement du réseau vasculaire au sein de ces échantillons. La présence de vaisseaux sur les zones contenant des macropores a pu être observée. Des vaisseaux semblent traverser les macropores des substrats et se localiser en particulier au niveau des angles de ces géométries. Des méthodes de caractérisation, adaptées à la localisation précise des vaisseaux au sein des implants, sont envisagées.

Enfin, des travaux similaires seront effectués avec des substrats macro-micro-poreux contenant différents taux de microporosité afin d'observer l'influence de la microporosité sur la migration cellulaire, la prolifération cellulaire et la vascularisation.

Conclusion générale et perspectives

Des biocéramiques macro-micro-poreuses monophasées en hydroxyapatite silicatée, de composition chimique $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_5,6(\text{SiO}_4)_{0,4}(\text{OH})_{1,6}$, ont été développées. Elles peuvent comporter des macropores de géométrie contrôlée dans l'intervalle de taille souhaitée (300-600 μm) pour la recolonisation par des tissus osseux et une large gamme de taux de microporosité ouverte maîtrisable (jusqu'à 37 %). Pour leur élaboration, des suspensions photosensibles chargées en particules céramiques ont été réalisées. Une formulation, permettant un bon compromis entre réactivité et taux de charge élevés, a été définie. Cette suspension a été utilisée pour mettre en forme des substrats macroporeux, couche par couche, par microstéréolithographie, à partir de données 2D informatisées (masques). Les paramètres du procédé ont été optimisés afin d'obtenir une bonne définition des pièces. L'étude de l'évolution de la surpolymérisation, en fonction des géométries des macropores, a conduit à l'établissement d'un modèle prédictif permettant le dimensionnement des masques. L'étude du frittage des pièces mises en forme par microstéréolithographie a permis la détermination des paramètres de traitement thermique pour l'obtention de taux de microporosité ouverte et/ou de valeurs de surface spécifique contrôlés. Enfin, la connaissance du retrait linéaire, selon le cycle thermique sélectionné, permet le dimensionnement des pièces en cru, et par conséquent celui des masques à partir du modèle prédictif établi, en fonction de la taille et de la géométrie de pores souhaitées. L'application de cette technique de fabrication additive innovante dans le domaine des céramiques, et en particulier la maîtrise de la définition des géométries de la porosité, constitue une avancée technologique intéressante qui peut trouver des applications dans des domaines variés.

L'étude de biocompatibilité réalisée *in vitro* sur l'hydroxyapatite silicatée a montré que l'adhésion et la viabilité cellulaires ne semblaient pas affectées par l'incorporation du silicium dans l'hydroxyapatite. L'étude de biocompatibilité *in vivo* a révélé, après 9 semaines d'implantation en site sous-cutané, une réponse inflammatoire légèrement plus élevée dans le cas de l'hydroxyapatite silicatée. Néanmoins, l'ensemble des résultats confirment la viabilité du matériau. Des substrats, contenant des macropores traversants de différentes géométries, ont pu être ainsi élaborés puis étudiés *in vitro* et *ex vivo*.

L'ensemencement de cellules préostéoblastes sur ces substrats a permis de remarquer deux étapes distinctes lors de la colonisation, *in vitro*, des macropores par les cellules. La première étape de colonisation semble être guidée par les interactions entre le matériau et les cellules. Le phénomène de colonisation cellulaire apparaît fortement influencé, dans un premier temps, par les paramètres dimensionnels et géométriques des macropores. Les cellules se répartissent de façon à combler prioritairement les concavités de ceux-ci. Le comblement complet des concavités par les cellules aboutit à la formation par ces dernières d'un cercle inscrit dans la géométrie de la section du macropore. Une seconde étape de colonisation cellulaire intervient. Cette dernière ne semble plus être directement influencée par les paramètres dimensionnels et géométriques des macropores, mais par les interactions entre cellules. L'ensemble de ces résultats conduit à envisager des géométries de macropores complexes, constituées de lignes brisées, comportant une faible quantité d'angles rentrants. Cependant, l'expérimentation a été menée en deux dimensions sur un seul niveau de profondeur des macropores et doit être étendue à plusieurs niveaux afin de préciser l'influence des paramètres architecturaux tridimensionnels sur la colonisation cellulaire.

Lors de l'étude *ex vivo*, un protocole d'implantation et d'extraction des substrats macroporeux, sur la membrane chorio-allantoïdienne d'embryons de poulets a été mis en place. Le développement du réseau vasculaire au sein de ces échantillons a pu être observé, en particulier sur les zones contenant des macropores. Les résultats préliminaires indiquent que les vaisseaux traversant les macropores des substrats semblent se localiser préférentiellement au niveau des angles de ces géométries. Ces premières observations sont prometteuses. Elles montrent que le modèle de la membrane chorio-allantoïdienne peut constituer un outil d'investigation particulièrement intéressant, alternatif à l'expérimentation animale *in vivo*, pour l'évaluation de la vascularisation des implants osseux. Il sera repris pour une étude plus complète en association avec des techniques plus précises de visualisation des vaisseaux.

En perspectives, des travaux similaires *in vitro* et *ex vivo* peuvent être envisagés avec des substrats macro-micro-poreux contenant différents taux de microporosité afin d'évaluer l'influence de la microporosité ouverte sur les phénomènes de migration et prolifération cellulaires, et de vascularisation.

L'influence de l'adsorption d'une protéine, l'insuline, à la surface des matériaux, a été étudiée par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier et dichroïsme circulaire. Ces techniques complémentaires ont permis de suggérer une modification de la conformation de

cette dernière lors de son adsorption. Le processus d'adsorption de l'insuline sur la surface de l'hydroxyapatite, substituée ou non, tendrait à modifier sa structure secondaire d'une majorité d'hélices- α à une conformation de type feuillet- β .

Aucune influence significative de l'insuline adsorbée en surface des implants, sur la réponse inflammatoire, n'a pu être observée *in vivo*, en site sous-cutané. L'absence d'effet de l'insuline pourrait s'expliquer par un relargage précoce de la protéine ou par une modification de sa fonctionnalité suite à son adsorption. Un greffage covalent sélectif de la protéine, en surface de la céramique, pourrait permettre le contrôle de son relargage et de sa conformation. L'incorporation maîtrisée du silicium dans les biocéramiques d'hydroxyapatite peut constituer, de ce point de vue, un atout important en procurant des sites privilégiés en surface de la céramique pour sa fonctionnalisation par des biomolécules actives dans les processus de formation osseuse (ostéogénèse, angiogénèse).

Au final, le procédé de microstéréolithographie s'est révélé performant pour la mise en forme de substrats macro-micro-poreux en hydroxyapatite silicatée. Cette technique de mise en forme peut être envisagée pour des applications dans le domaine de l'ingénierie des tissus osseux, en particulier pour le développement de substituts osseux en céramique sur mesure comportant des architectures complexes et une porosité multiéchelle contrôlées.

Références bibliographiques

1. Legros R, Balmain N, Bonel G. Structure and composition of the mineral phase of periosteal bone. *J. Chem. Res. Synop.* 1986;8–9.
2. Barradas AMC, Yuan H, Van Blitterswijk CA, Habibovic P. Osteoinductive biomaterials: current knowledge of properties, experimental models and biological mechanisms. *Eur. Cell. Mater.* 2011;21:407–29.
3. Dimitriou R, Mataliotakis GI, Angoules AG, Kanakaris NK, Giannoudis PV. Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the RIA: A systematic review. *Injury.* 2011;42, Supplement 2:S3–15.
4. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury.* 2005;36 Suppl 3:S20–7.
5. Heary RF, Schlenk RP, Sacchieri TA, Barone D, Brotea C. Persistent iliac crest donor site pain: independent outcome assessment. *Neurosurgery.* 2002;50:510–6.
6. Sanchez-Salcedo S, Nieto A, Vallet-Regi M. Hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate/agarose macroporous scaffolds for bone tissue engineering. *Chem. Eng. J.* 2008;137:62–71.
7. Böhner M. Resorbable biomaterials as bone graft substitutes. *Mater. Today.* 2010;13:24–30.
8. Bose S, Roy M, Bandyopadhyay A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends Biotechnol.* 2012;30:546–54.
9. Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials.* 2000;21:2529–43.
10. Rezwan K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2006;27:3413–31.
11. Oh S, Oh N, Appleford M, Ong JL. Bioceramics for Tissue Engineering Applications - A Review. *Am. J. Biochem. Biotechnol.* 2006;2:49–56.
12. Barrère F, Van Blitterswijk CA, De Groot K. Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. *Int. J. Nanomedicine.* 2006;1:317–32.
13. LeGeros RZ. Calcium Phosphate-Based Osteoinductive Materials. *Chem Rev.* 2008;108:4742–53.
14. Böhner M, Galea L, Doeblin N. Calcium phosphate bone graft substitutes: Failures and hopes. *J. Eur. Ceram. Soc.* 2012;32:2663–71.

15. Götz W, Lenz S, Reichert C, Henkel K-O, Bienengräber V, Pernicka L, et al. A preliminary study in osteoinduction by a nano-crystalline hydroxyapatite in the mini pig. *Folia Histochem. Cytobiol. Pol. Acad. Sci.* 2010;48:589–96.
16. Bonassar LJ, Vacanti CA. Tissue engineering: the first decade and beyond. *J. Cell. Biochem. Suppl.* 1998;30-31:297–303.
17. Wagoner Johnson A, Herschler BA. A review of the mechanical behavior of CaP and CaP/polymer composites for applications in bone replacement and repair. *Acta Biomater.* 2011;7:16–30.
18. Petite H, Viateau V, Bensaid W, Meunier A, De Pollak C, Bourguignon M, et al. Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotech.* 2000;18:959–63.
19. Boyan BD, Hummert TW, Dean DD, Schwartz Z. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials.* 1996;17:137–46.
20. Bose S, Tarafder S. Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: a review. *Acta Biomater.* 2012;8:1401–21.
21. Boanini E, Gazzano M, Bigi A. Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature. *Acta Biomater.* 2010;6:1882–94.
22. Suchanek WL, Byrappa K, Shuk P, Riman RE, Janas VF, TenHuisen KS. Preparation of magnesium-substituted hydroxyapatite powders by the mechanochemical–hydrothermal method. *Biomaterials.* 2004;25:4647–57.
23. Grandjean-Laquerriere A, Laquerriere P, Jallot E, Nedelec J-M, Guenounou M, Laurent-Maquin D, et al. Influence of the zinc concentration of sol-gel derived zinc substituted hydroxyapatite on cytokine production by human monocytes in vitro. *Biomaterials.* 2006;27:3195–200.
24. Bigi A, Boanini E, Capuccini C, Gazzano M. Strontium-substituted hydroxyapatite nanocrystals. *Inorganica Chim. Acta.* 2007;360:1009–16.
25. Pusparini E, Sopyan I, Hamdi M, Ramesh S. Sodium-Doped Hydroxyapatite Nanopowder through Sol-Gel Method: Synthesis and Characterization. *Mater. Sci. Forum.* 2011;694:128–32.
26. Wei M, Vellinga D, Leavesley D, Evans-Freeman JH, Upton Z. Cell Attachment and Proliferation on Hydroxyapatite and Ion Substituted Hydroxyapatites. *Key Eng. Mater.* 2003;240-242:671–4.
27. Lafon J-P. Synthèse, stabilité thermique et frittage d'hydroxyapatites carbonatées [thèse]. Université de Limoges; 2004.
28. Pietak AM, Reid JW, Stott MJ, Sayer M. Silicon substitution in the calcium phosphate bioceramics. *Biomaterials.* 2007;28:4023–32.
29. Jugdaohsingh R. Silicon and bone health. *J. Nutr. Health Aging.* 2007;11:99–110.
30. Carlisle EM. Silicon: A Possible Factor in Bone Calcification. *Science.* 1970;167:279–80.

31. Schwarz K. A bound form of silicon in glycosaminoglycans and polyuronides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1973;70:1608–12.
32. Schwarz K, Milne DB. Growth-promoting Effects of Silicon in Rats. *Nature.* 1972;239:333–4.
33. Carlisle EM. Silicon: An Essential Element for the Chick. *Science.* 1972;178:619–21.
34. Carlisle EM. Biochemical and morphological changes associated with long bone abnormalities in silicon deficiency. *J. Nutr.* 1980;110:1046–56.
35. Eisinger J, Clairet D. Effects of silicon, fluoride, etidronate and magnesium on bone mineral density: a retrospective study. *Magnes. Res.* 1993;6:247–9.
36. Jugdaohsingh R, Tucker KL, Qiao N, Cupples LA, Kiel DP, Powell JJ. Dietary Silicon Intake Is Positively Associated With Bone Mineral Density in Men and Premenopausal Women of the Framingham Offspring Cohort. *J. Bone Miner. Res.* 2004;19:297–307.
37. Calomme MR, Vanden Berghe DA. Supplementation of calves with stabilized orthosilicic acid. Effect on the Si, Ca, Mg, and P concentrations in serum and the collagen concentration in skin and cartilage. *Biol. Trace Elem. Res.* 1997;56:153–65.
38. Seaborn CD, Nielsen FH. Silicon deprivation decreases collagen formation in wounds and bone, and ornithine transaminase enzyme activity in liver. *Biol. Trace Elem. Res.* 2002;89:251–61.
39. Hott M, De Pollak C, Modrowski D, Marie PJ. Short-term effects of organic silicon on trabecular bone in mature ovariectomized rats. *Calcif. Tissue Int.* 1993;53:174–9.
40. Keeting PE, Oursler MJ, Wiegand KE, Bonde SK, Spelsberg TC, Riggs BL. Zeolite A increases proliferation, differentiation, and transforming growth factor beta production in normal adult human osteoblast-like cells in vitro. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 1992;7:1281–9.
41. Arumugam MQ, Ireland DC, Brooks RA, Rushton N, Bonfield W. The Effect Orthosilicic Acid on Collagen Type I, Alkaline Phosphatase and Osteocalcin mRNA Expression in Human Bone-Derived Osteoblasts In Vitro. *Key Eng. Mater.* 2006;309-311:121–4.
42. Reffitt DM, Ogston N, Jugdaohsingh R, Cheung HFJ, Evans BAJ, Thompson RPH, et al. Orthosilicic acid stimulates collagen type 1 synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro. *Bone.* 2003;32:127–35.
43. Kim E-J, Bu S-Y, Sung M-K, Choi M-K. Effects of silicon on osteoblast activity and bone mineralization of MC3T3-E1 cells. *Biol. Trace Elem. Res.* 2013;152:105–12.
44. Tanizawa Y, Suzuki T. Effects of silicate ions on the formation and transformation of calcium phosphates in neutral aqueous solutions. *J Chem Soc Faraday Trans.* 1995;91:3499–503.
45. Damen JJ, Ten Cate JM. Silica-induced precipitation of calcium phosphate in the presence of inhibitors of hydroxyapatite formation. *J. Dent. Res.* 1992;71:453–7.

46. Gibson IR, Best SM, Bonfield W. Chemical characterization of silicon-substituted hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res.* 1999;44:422–8.
47. Vallet-Regí M, Arcos D. Silicon substituted hydroxyapatites. A method to upgrade calcium phosphate based implants. *J Mater Chem.* 2005;15:1509–16.
48. Palard M, Combes J, Champion E, Foucaud S, Rattner A, Bernache-Assollant D. Effect of silicon content on the sintering and biological behaviour of $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{SiO}_4)_x(\text{OH})_{2-x}$ ceramics. *Acta Biomater.* 2009;5:1223–32.
49. Botelho CM, Brooks RA, Spence G, McFarlane I, Lopes MA, Best SM, et al. Differentiation of mononuclear precursors into osteoclasts on the surface of Si-substituted hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res Part A.* 2006;78A:709–20.
50. Botelho CM, Brooks RA, Best SM, Lopes MA, Santos JD, Rushton N, et al. Human osteoblast response to silicon-substituted hydroxyapatite. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2006;79:723–30.
51. Patel N, Best SM, Bonfield W, Gibson IR, Hing KA, Damien E, et al. A comparative study on the in vivo behavior of hydroxyapatite and silicon substituted hydroxyapatite granules. *J Mater Sci Mater Med.* 2002;13:1199–206.
52. Hing KA, Revell PA, Smith N, Buckland T. Effect of silicon level on rate, quality and progression of bone healing within silicate-substituted porous hydroxyapatite scaffolds. *Biomaterials.* 2006;27:5014–26.
53. Hing KA, Wilson LF, Buckland T. Comparative performance of three ceramic bone graft substitutes. *Spine J. Off. J. North Am. Spine Soc.* 2007;7:475–90.
54. Botelho CM, Lopes MA, Gibson IR, Best SM, Santos JD. Structural analysis of Si-substituted hydroxyapatite: zeta potential and X-ray photoelectron spectroscopy. *J Mater Sci Mater Med.* 2002;13:1123–7.
55. Balas F, Pérez-Pariente J, Vallet-Regí M. In vitro bioactivity of silicon-substituted hydroxyapatites. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2003;66A:364–75.
56. Nakata K, Kubo T, Numako C, Onoki T, Nakahira A. Synthesis and Characterization of Silicon-Doped Hydroxyapatite. *Mater. Trans.* 2009;50:1046–9.
57. Hayakawa S, Kanaya T, Tsuru K, Shirosaki Y, Osaka A, Fujii E, et al. Heterogeneous structure and in vitro degradation behavior of wet-chemically derived nanocrystalline silicon-containing hydroxyapatite particles. *Acta Biomater.* 2013;9:4856–67.
58. Guth K, Buckland T, Hing KA. Silicon Dissolution from Microporous Silicon Substituted Hydroxyapatite and its Effect on Osteoblast Behaviour. *Key Eng. Mater.* 2006;309-311:117–20.
59. Porter AE, Patel N, Skepper JN, Best SM, Bonfield W. Effect of sintered silicate-substituted hydroxyapatite on remodelling processes at the bone-implant interface. *Biomaterials.* 2004;25:3303–14.

60. Porter AE, Botelho CM, Lopes MA, Santos JD, Best SM, Bonfield W. Ultrastructural comparison of dissolution and apatite precipitation on hydroxyapatite and silicon-substituted hydroxyapatite in vitro and in vivo. *J Biomed Mater Res Part A*. 2004;69A:670–9.
61. Gibson IR, Best SM, Bonfield W. Effect of silicon substitution on the sintering and microstructure of hydroxyapatite. *J Am Ceram Soc*. 2002;85:2771–7.
62. Arcos D, Rodriguez-Carvajal J, Vallet-Regi M. Silicon Incorporation in Hydroxylapatite Obtained by Controlled Crystallization. *Chem Mater*. 2004;16:2300–8.
63. Böhner M. Silicon-substituted calcium phosphates – A critical view. *Biomaterials*. 2009;30:6403–6.
64. Lu X, Leng Y. Theoretical analysis of calcium phosphate precipitation in simulated body fluid. *Biomaterials*. 2005;26:1097–108.
65. Gasquères G, Bonhomme C, Maquet J, Babonneau F, Hayakawa S, Kanaya T, et al. Revisiting silicate substituted hydroxyapatite by solid-state NMR. *Magn. Reson. Chem. MRC*. 2008;46:342–6.
66. Mastrogiacomo M, Corsi A, Francioso E, Di Comite M, Monetti F, Scaglione S, et al. Reconstruction of extensive long bone defects in sheep using resorbable bioceramics based on silicon stabilized tricalcium phosphate. *Tissue Eng*. 2006;12:1261–73.
67. Best SM, Zou S, Brooks R, Huang J, Rushton N, Bonfield W. The osteogenic behaviour of silicon substituted hydroxyapatite. *Bioceramics*. 2008;361-363:985–8.
68. Thian ES, Huang J, Best SM, Barber ZH, Brooks RA, Rushton N, et al. The response of osteoblasts to nanocrystalline silicon-substituted hydroxyapatite thin films. *Biomaterials*. 2006;27:2692–8.
69. Durrieu MC, Pallu S, Guillemot F, Bareille R, Amédée J, Baquay CH, et al. Grafting RGD containing peptides onto hydroxyapatite to promote osteoblastic cells adhesion. *J. Mater. Sci. Mater. Med*. 2004;15:779–86.
70. Douard N. *Élaboration et fonctionnalisation de biocéramiques phosphocalciques [thèse]*. Université de Limoges; 2010.
71. Hijón N, Victoria Cabañas M, Peña J, Vallet-Regí M. Dip coated silicon-substituted hydroxyapatite films. *Acta Biomater*. 2006;2:567–74.
72. Arcos D, Rodriguez-Carvajal J, Vallet-Regi M. The effect of the silicon incorporation on the hydroxylapatite structure. A neutron diffraction study. *Solid State Sci*. 2004;6:987–94.
73. Boyer L, Carpena J, Lacout JL. Synthesis of phosphate-silicate apatites at atmospheric pressure. *Solid State Ion*. 1997;95:121–9.
74. Aminian A, Solati-Hashjin M, Samadikuchaksaraei A, Bakhshi F, Gorjipour F, Farzadi A, et al. Synthesis of silicon-substituted hydroxyapatite by a hydrothermal method with two different phosphorous sources. *Ceram. Int*. 2011;37:1219–29.

75. Tanizawa Y, Suzuki T. X-ray photoelectron spectroscopy study on silicate-containing apatite. *Phosphorus Res Bull.* 1994;4:83–8.
76. Tang XL, Xiao XF, Liu RF. Structural characterization of silicon-substituted hydroxyapatite synthesized by a hydrothermal method. *Mater Lett.* 2005;59:3841–6.
77. Palard M, Champion E, Foucaud S. Synthesis of silicated hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{x}(\text{SiO}_4)\text{x}(\text{OH})_{2-\text{x}}$. *J. Solid State Chem.* 2008;181:1950–60.
78. Marchat D, Zymelka M, Coelho C, Gremillard L, Joly-pottuz L, Babonneau F, et al. Accurate characterization of pure silicon-substituted hydroxyapatite powders synthesized by a new precipitation route. *Acta Biomater.* 2013;9:6992–7004.
79. Kim SR, Lee JH, Kim YT, Riu DH, Jung SJ, Lee YJ, et al. Synthesis of Si, Mg substituted hydroxyapatites and their sintering behaviors. *Biomaterials.* 2003;24:1389–98.
80. Leventouri T, Bunaciu CE, Perdikatsis V. Neutron powder diffraction studies of silicon-substituted hydroxyapatite. *Biomaterials.* 2003;24:4205–11.
81. Lozano D, Feito MJ, Portal-Nunez S, Lozano RM, Matesanz MC, Serrano MC, et al. Osteostatin improves the osteogenic activity of fibroblast growth factor-2 immobilized in Si-doped hydroxyapatite in osteoblastic cells. *Acta Biomater.* 2012;8:2770–7.
82. Palard M. Synthèse et frittage d'hydroxyapatites phosphocalciques silicatées [thesis]. University of Limoges; 2007.
83. Champion E. Sintering of calcium phosphate bioceramics. *Acta Biomater.* 2013;9:5855–75.
84. Rouquerol J, Avnir D, Everett DH, Fairbridge C, Haynes M, Pernicone N, et al. Guidelines for the Characterization of Porous Solids. *Stud. Surf. Sci. Catal.* 1994;1–9.
85. Nič M, Jirát J, Košata B, Jenkins A, McNaught A, editors. Porosity. IUPAC Compendium of Chemical Terminology. Oxford ; 1997.
86. Chotard-Ghodsni R, Lucas S, Pagnoux C, Champion E, Viana M, Chulia D, et al. Elaboration of a Well-Ordered Porous Bioceramic via a Heterocoagulation Colloidal Process. *Key Eng. Mater.* 2009;396-398:515–8.
87. Destainville A. Synthèse de phosphate tricalcique apatitique [Thèse]. 2002.
88. Karageorgiou V, Kaplan DL. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials.* 2005;26:5474–91.
89. Washburn EW. Note on a Method of Determining the Distribution of Pore Sizes in a Porous Material. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1921;7:115–6.
90. Bruckschen B, Seitz H, Buzug T., Tille C, Leukers B, Irsen S. Comparing Different Porosity Measurement Methods for Characterisation of 3D Printed Bone Replacement Scaffolds. *Biomed. Tech.* 2005;1609–10.

91. Klein M, Goetz H, Pazen S, Al-Nawas B, Wagner W, Duschner H. Pore characteristics of bone substitute materials assessed by microcomputed tomography. *Clin. Oral Implants Res.* 2009;20:67–74.
92. Cooper D, Matyas J, Katzenberg M, Hallgrissom B. Comparison of Microcomputed Tomographic and Microradiographic Measurements of Cortical Bone Porosity. *Calcif. Tissue Int.* 2004;74:437–47.
93. Cartmell S, Huynh K, Lin A, Nagaraja S, Guldberg R. Quantitative microcomputed tomography analysis of mineralization within three-dimensional scaffolds in vitro. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2004;69A:97–104.
94. Le Huec T, Schaefferbeke T, Faber J, Le Rebeller A. Influence of porosity on the mechanical resistance of hydroxyapatite ceramics under compressive stress. *Biomaterials.* 1995;16:113–8.
95. Gauthier O, Bouler J, Aguado E, Pilet P, Daculsi G. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. *Biomaterials.* 1998;19:133–9.
96. Hing KA, Best SM, Tanner KE, Bonfield W, Revell PA. Quantification of bone ingrowth within bone-derived porous hydroxyapatite implants of varying density. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 1999;10:663–70.
97. Krut MC, Dhert WJA, Oner C, van Blitterswijk CA, Verbout AJ, de Bruijn JD. Optimization of bone-tissue engineering in goats. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2004;69B:113–20.
98. Hing KA, Best SM, Tanner KE, Bonfield W, Revell PA. Mediation of bone ingrowth in porous hydroxyapatite bone graft substitutes. *J Biomed Mater Res.* 2004;68A:187–200.
99. Hulbert SF, Morrison SJ, Klawitter JJ. Tissue reaction to three ceramics of porous and non-porous structures. *J. Biomed. Mater. Res.* 1972;6:347–74.
100. Akay G, Birch MA, Bokhari MA. Microcellular polyHIPE polymer supports osteoblast growth and bone formation in vitro. *Biomaterials.* 2004;25:3991–4000.
101. Daculsi G, Passuti N. Effect of the macroporosity for osseous substitution of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials.* 1990;11:86–7.
102. Uchida A, Nade SM, McCartney ER, Ching W. The use of ceramics for bone replacement. A comparative study of three different porous ceramics. *J. Bone Joint Surg. Br.* 1984;66-B:269–75.
103. Chang B, Lee C, Hong K, Youn H, Ryu H, Chung S, et al. Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations. *Biomaterials.* 2000;21:1291–8.
104. Habibovic P, Sees TM, van den Doel M, Clemens A, Blitterswijk CA. Osteoinduction by biomaterials—Physicochemical and structural influences. *J Biomed Mater Res.* 2006;77A:747–62.

105. Kühne JH, Bartl R, Frisch B, Hammer C, Jansson V, Zimmer M. Bone formation in coralline hydroxyapatite. Effects of pore size studied in rabbits. *Acta Orthop. Scand.* 1994;65:246–52.
106. Schwartz I, Robinson BP, Hollinger JO, Szachowicz EH, Brekke J. Calvarial bone repair with porous D, L-poly lactide. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 1995;112:707–13.
107. Tsuruga E, Takita H, Itoh H, Wakisaka Y, Kuboki Y. Pore Size of Porous Hydroxyapatite as the Cell-Substratum Controls BMP-Induced Osteogenesis. *J. Biochem. (Tokyo).* 1997;121:317–24.
108. Ayers RA, Simske SJ, Bateman TA, Petkus A, Sachdeva RLC, Gyunter VE. Effect of nitinol implant porosity on cranial bone ingrowth and apposition after 6 weeks. *J. Biomed. Mater. Res.* 1999;45:42–7.
109. Kuboki Y, Jin Q, Takita H. Geometry of carriers controlling phenotypic expression in BMP-induced osteogenesis and chondrogenesis. *J. Bone Joint Surg. Am.* 2001;83-A Suppl 1:S105–15.
110. Schek RM, Wilke EN, Hollister SJ, Krebsbach PH. Combined use of designed scaffolds and adenoviral gene therapy for skeletal tissue engineering. *Biomaterials.* 2006;27:1160–6.
111. Roosa SMM, Kempainen JM, Moffitt EN, Krebsbach PH, Hollister SJ. The pore size of polycaprolactone scaffolds has limited influence on bone regeneration in an in vivo model. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 92A:359–68.
112. Fukuda A, Takemoto M, Saito T, Fujibayashi S, Neo M, Pattanayak DK, et al. Osteoinduction of porous Ti implants with a channel structure fabricated by selective laser melting. *Acta Biomater.* 2011;7:2327–36.
113. Ciara M. Murphy MGH, Fergal J. O'Brien. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen–glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2010;31:461–6.
114. Hutmacher DW. Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues--state of the art and future perspectives. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2001;12:107–24.
115. Hui PW, Leung PC, Sher A. Fluid conductance of cancellous bone graft as a predictor for graft-host interface healing. *J. Biomech.* 1996;29:123–32.
116. Ferry P.W. Melchels AMCB, Clemens A. van Blitterswijk, Jan de Boer, Jan Feijen, Dirk W. Grijpma. Effects of the architecture of tissue engineering scaffolds on cell seeding and culturing. *Acta Biomater.* 2010;6:4208–17.
117. Eggli PS, Moller W, Schenk RK. Porous Hydroxyapatite and Tricalcium Phosphate Cylinders with Two Different Pore Size Ranges Implanted in the Cancellous Bone of Rabbits: A Comparative Histomorphometric and Histologic Study of Bony Ingrowth and Implant Substitution. *Clin. Orthop.* 1988;232:127–38.
118. Lu JX, Flautre B, Anselme K, Hardouin P, Gallur A, Descamps M, et al. Role of interconnections in porous bioceramics on bone recolonization in vitro and in vivo. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 1999;10:111–20.

119. Flautre B, Descamps M, Delecourt, Blary, Hardouin P. Porous HA ceramic for bone replacement: role of the pores and interconnections - experimental study in the rabbit. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2001;12:679–82.
120. Rose F, Cyster L, Grant D, Scotchford S, Howdle S, Shakesheff K. In vitro assessment of cell penetration into porous hydroxyapatite scaffolds with a central aligned channel. *Biomaterials.* 2004;25:5507–14.
121. Woesz A, Rumpler M, Stampfl J, Varga F, Fratzl Zelman N, Roschger P, et al. Towards bone replacement materials from calcium phosphates via rapid prototyping and ceramic gelcasting. *Mater. Sci. Eng. C.* 2005;25:181–6.
122. Kumar G, Tison CK, Chatterjee K, Pine PS, McDaniel JH, Salit ML, et al. The determination of stem cell fate by 3D scaffold structures through the control of cell shape. *Biomaterials.* 2011;32:9188–96.
123. Rumpler M, Woesz A, Dunlop JW., Van Dongen JT, Fratzl P. The effect of geometry on three-dimensional tissue growth. *J. R. Soc. Interface.* 2008;5:1173–80.
124. Bidan CM, Kommareddy KP, Rumpler M, Kollmannsberger P, Bréchet YJM, Fratzl P, et al. How linear tension converts to curvature: geometric control of bone tissue growth. *PloS One.* 2012;7:e36336.
125. Jin Q, Takita H, Kohgo T, Atsumi K, Itoh H, Kuboki Y. Effects of geometry of hydroxyapatite as a cell substratum in BMP-induced ectopic bone formation. *J Biomed Mater Res.* 2000;51:491–9.
126. Chu GTM, Halloran JW, Orton D, Hollister SJ, Feinberg S. Mechanical and in vivo performance of hydroxyapatite implants with controlled architectures. *Biomaterials.* 2002;23:1283–93.
127. Jones J, Atwood R, Poologasundarampillai G, Yue S, Lee P. Quantifying the 3D macrostructure of tissue scaffolds. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2009;20:463–71.
128. Stein GS, Lian JB. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr Rev.* 1993;14:424–42.
129. Bidan CM, Kommareddy KP, Rumpler M, Kollmannsberger P, Fratzl P, Dunlop JWC. Geometry as a factor for tissue growth: towards shape optimization of tissue engineering scaffolds. *Adv. Healthc. Mater.* 2013;2:186–94.
130. Kollmannsberger P, Bidan CM. The physics of tissue patterning and extracellular matrix organisation: how cells join forces. *Soft Matter.* 2011;7:9549–60.
131. Vogel V, Sheetz MP. Cell fate regulation by coupling mechanical cycles to biochemical signaling pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2009;21:38–46.
132. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell.* 2006;126:677–89.

133. Marklein RA, Burdick JA. Controlling stem cell fate with material design. *Adv. Mater. Deerfield Beach Fla.* 2010;22:175–89.
134. Nelson CM, Jean RP, Tan JL, Liu WF, Sniadecki NJ, Spector AA, et al. Emergent patterns of growth controlled by multicellular form and mechanics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005;102:11594–9.
135. Lu JX, Gallur A, Flautre B, Anselme K, Descamps M, Thierry B, et al. Comparative study of tissue reactions to calcium phosphate ceramics among cancellous, cortical, and medullar bone sites in rabbits. *J. Biomed. Mater. Res.* 1998;42:357–67.
136. Fujibayashi S, Neo M, Kim H-M, Kokubo T, Nakamura T. Osteoinduction of porous bioactive titanium metal. *Biomaterials.* 2004;25:443–50.
137. Fellah BH, Gauthier O, Weiss P, Chappard D, Layrolle P. Osteogenicity of biphasic calcium phosphate ceramics and bone autograft in a goat model. *Biomaterials.* 2008;29:1177–88.
138. Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials.* 2000;21:667–81.
139. Yuan H, Kurashina K, de Bruijn JD, Li Y, de Groot K, Zhang X. A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials.* 1999;20:1799–806.
140. Daculsi G, LeGeros R, Heughebaert M, Barbieux I. Formation of carbonate-apatite crystals after implantation of calcium phosphate ceramics. *Calcif. Tissue Int.* 1990;46:20–7.
141. Posner AS, Betts F. Synthetic amorphous calcium phosphate and its relation to bone mineral structure. *Acc. Chem. Res.* 1975;8:273–81.
142. Taylor AJ, Rendina E, Smith BJ, Zhou DH. Analyses of mineral specific surface area and hydroxyl substitution for intact bone. *Chem. Phys. Lett.* 2013;588:124–30.
143. Rouahi M, Gallet O, Champion E, Dentzer J, Hardouin P, Anselme K. Influence of hydroxyapatite microstructure on human bone cell response. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2006;78A:222–35.
144. Isaac J, Hornez J-C, Jian D, Descamps M, Hardouin P, Magne D. β -TCP microporosity decreases the viability and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2008;86A:386–93.
145. Zhu XD, Zhang HJ, Fan HS, Li W, Zhang XD. Effect of phase composition and microstructure of calcium phosphate ceramic particles on protein adsorption. *Acta Biomater.* 6:1536–41.
146. Wei J, Jia J, Wu F, Wei S, Zhou H, Zhang H, et al. Hierarchically microporous/macroporous scaffold of magnesium–calcium phosphate for bone tissue regeneration. *Biomaterials.* 2010;31:1260–9.
147. Li X, Liu H, Niu X, Fan Y, Feng Q, Cui F, et al. Osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells induced by osteoinductive calcium phosphate ceramics. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2011;97B:10–9.

148. Okuda T, Ioku K, Yonezawa I, Minagi H, Kawashi G. The effect of the microstructure of β -tricalcium phosphate on the metabolism of subsequently formed bone tissue. *Biomaterials*. 2007;28:2612–21.
149. Sheeny K, Lan Levengood SJP, Matthew B. Wheeler, Aaron J. Maki, Sherrie G. Clark,, Russell D. Jamison AJWJ. Multiscale osteointegration as a new paradigm for the design of calcium phosphate scaffolds for bone regeneration. *Biomaterials*. 2010;31:3552–63.
150. Habibovic P, yuan H, Van Der Valk C, Meijer G, Blitterswijk CA, De Groot K. 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials*. 2005;26:3565–75.
151. Cheng L, Ye F, Yang R, Lu X, Shi Y, Li L, et al. Osteoinduction of hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate bioceramics in mice with a fractured fibula. *Acta Biomater*. 2010;6:1569–74.
152. Gadiou R, dos Santos EA, Vijayaraj M, Anselme K, Dentzer J, Soares GA, et al. Temperature-programmed desorption as a tool for quantification of protein adsorption capacity in micro- and nanoporous materials. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 2009;73:168–74.
153. Guan J, Sacks MS, Beckman EJ, Wagner WR. Biodegradable poly(ether ester urethane)urea elastomers based on poly(ether ester) triblock copolymers and putrescine: synthesis, characterization and cytocompatibility. *Biomaterials*. 2004;25:85–96.
154. Bignon A, Chouteau J, Chevalier J, Fantozzi G, Carret J, Chavassieux P, et al. Effect of micro and macro porosity of bone substitutes on their mechanical properties and cellular response. *J. Mater. Sci. Mater. Med*. 2003;14:1089–97.
155. Annaz B, Hing KA, Kayser M, Buckland T, Di Silvio L. Porosity variation in hydroxyapatite and osteoblast morphology: a scanning electron microscopy study. *J. Microsc*. 2004;215:100–10.
156. Ohtsubo S, Matsuda M, Takekawa M. Angiogenesis after sintered bone implantation in rat parietal bone. *Histol. Histopathol*. 2003;18:153–63.
157. Tatsumi J, Kurihara N, Takahashi T, Shimoyama M, Karami K, Ikeda K. [Clinical application of sintered bone (1). In vitro study]. *Nihon Shishubyo Gakkai Kaishi*. 1988;30:164–71.
158. Matsuda M, Kita S, Takekawa M, Ohtsubo S, Tsuyama K. Scanning electron and light microscopic observations on the healing process after sintered bone implantation in rats. *Histol. Histopathol*. 1995;10:673–9.
159. Hing KA, Annaz B, Saeed P, Revell PA, Buckland T. Microporosity enhances bioactivity of synthetic bone graft substitutes. *J. Mater. Sci. Mater. Med*. 2005;16:467–75.
160. Malmström J, Adolfsson E, Arvidsson A, Thomsen P. Bone Response Inside Free-Form Fabricated Macroporous Hydroxyapatite Scaffolds with and without an Open Microporosity. *Clin. Implant Dent. Relat. Res*. 2007;9:79–88.

161. Lan Levengood S, Polak S, Poellmann M, Hoelzle D, Maki A, Clark S, et al. The effect of BMP-2 on micro- and macroscale osteointegration of biphasic calcium phosphate scaffolds with multiscale porosity. *Acta Biomater.* 2010;6:3283–91.
162. Polak S, Lan Levengood S, Wheelen M, Maki A, Clark S, Wagoner Johnson AJ. Analysis of the roles of microporosity and BMP-2 on multiple measures of bone regeneration and healing in calcium phosphate scaffolds. *Acta Biomater.* 2011;7:1760–71.
163. Woodard J, Hildore A, Lan S, Park C, Morgan A. The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity. *Biomaterials.* 2007;28:45–54.
164. Guicheux J, Gauthier O, Aguado E, Pilet P, Couillaud S, Jegou D, et al. Human Growth Hormone Locally Released in Bone Sites by Calcium-Phosphate Biomaterial Stimulates Ceramic Bone Substitution Without Systemic Effects: A Rabbit Study. *J. Bone Miner. Res.* 1998;13:739–48.
165. Koempel JA, Patt BS, O’Grady K, Wozney J, Toriumi DM. The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on the integration of porous hydroxyapatite implants with bone. *J. Biomed. Mater. Res.* 1998;41:359–63.
166. Dellinger J, Eurell J, Jamison R. Bone response to 3D periodic hydroxyapatite scaffolds with and without tailored microporosity to deliver bone morphogenetic protein 2. *J Biomed Mater Res.* 2005;366–76.
167. Kundu B, Soundrapandian C, Nandi SK, Mukherjee P, Dandapat N, Roy S, et al. Development of new localized drug delivery system based on ceftriaxone-sulbactam composite drug impregnated porous hydroxyapatite: a systematic approach for in vitro and in vivo animal trial. *Pharm. Res.* 2010;27:1659–76.
168. Chai F, Hornez J, Blanchemain N, Neut C, Descamps M, Hildebrand H. Antibacterial activation of hydroxyapatite (HA) with controlled porosity by different antibiotics. *Biomol. Eng.* 2007;24:510–4.
169. Cordell J, Vogl M, Wagoner Johnson A. The influence of micropore size on the mechanical properties of bulk hydroxyapatite and hydroxyapatite scaffolds. *J Pournal Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2009;2:560–70.
170. Leong K, Cheah C, Chua C. Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. *Biomaterials.* 2003;24:2363–78.
171. Studart AR, Gonzenbach UT, Tervoort E, Gauckler LJ. Processing Routes to Macroporous Ceramics: A Review. *J. Am. Ceram. Soc.* 2006;89:1771–89.
172. Chevalier C, Pouget, Viana. Fabrication of Porous Substrates: A Review of Processes Using Pore Forming Agents in the Biomaterial Field. *J. Pharm. Sci.* 2007;96.
173. Fellah BH, Layrolle P. Sol-gel synthesis and characterization of macroporous calcium phosphate bioceramics containing microporosity. *Acta Biomater.* 2009;5:735–42.
174. Descamps M, Duhoo T, Monchau F, Lu J, Hardouin P, Hornez J, et al. Manufacture of macroporous β -tricalcium phosphate bioceramics. *J. Eur. Ceram. Soc.* 2008;28:149–57.

175. Kim H, Knowles J, Kim H. Hydroxyapatite/poly(ϵ -caprolactone) composite coatings on hydroxyapatite porous bone scaffold for drug delivery. *Biomaterials*. 2004;25:1279–87.
176. Abdelaal OAM, Darwish SMH. Review of Rapid Prototyping Techniques for Tissue Engineering Scaffolds Fabrication. *Charact. Dev. Biosyst. Biomater.* Springer Berlin Heidelberg; 2013. p. 33–54.
177. Wilson CE, Blitterswijk CA, Verbout AJ, Dhert WJA, Bruijn JD. Scaffolds with a standardized macro-architecture fabricated from several calcium phosphate ceramics using an indirect rapid prototyping technique. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 22:97–105.
178. Sachlos E, Czernuszka J. Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *Eur. Cell. Mater.* 2003;5:29–40.
179. Pham DT, Gault RS. A comparison of rapid prototyping technologies. *Int. J. Mach. Tools Manuf.* 1998;38:1257–87.
180. Gibson I, Shi D. Material properties and fabrication parameters in selective laser sintering process. *Rapid Prototyp. J.* 1997;3:129–36.
181. Leong KF, Phua KK, Chua CK, Du ZH, Teo KO. Fabrication of porous polymeric matrix drug delivery devices using the selective laser sintering technique. *Proc. Inst. Mech. Eng. [H]*. 2001;215:191–201.
182. Lee G, Barlow J. Selective laser sintering of calcium phosphate powders. *Proc. Solid Free. Fabr. Symp.* 1994;191–7.
183. Eosoly S, Brabazon D, Lohfeld S, Looney L. Selective laser sintering of hydroxyapatite/poly- ϵ -caprolactone scaffolds. *Acta Biomater.* 2010;6:2511–7.
184. Bourell DL, Marcus HL, Barlow JW, Beaman JJ. Selective laser sintering of metals and ceramics. *Int. J. Powder Metall.* 1992;28:369–81.
185. Wang Y, Shen Y, Wang Z, Yang J, Liu N, Huang W. Development of highly porous titanium scaffolds by selective laser melting. *Mater. Lett.* 2010;64:674–6.
186. Lindner M, Hoeges S, Meiners W, Wissenbach K, Smeets R, Telle R, et al. Manufacturing of individual biodegradable bone substitute implants using selective laser melting technique. *J. Biomed. Mater. Res. A*. 2011;97:466–71.
187. Li X, Wang C, Zhang W, Li Y. Fabrication and compressive properties of Ti6Al4V implant with honeycomb-like structure for biomedical applications. *Rapid Prototyp. J.* 2010;16:44–9.
188. Parthasarathy J, Starly B, Raman S, Christensen A. Mechanical evaluation of porous titanium (Ti6Al4V) structures with electron beam melting (EBM). *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2010;3:249–59.
189. Duan B, Wang M, Zhou WY, Cheung WL, Li ZY, Lu WW. Three-dimensional nanocomposite scaffolds fabricated via selective laser sintering for bone tissue engineering. *Acta Biomater.* 2010;6:4495–505.

190. Van Bael S, Chai YC, Truscetto S, Moesen M, Kerckhofs G, Van Oosterwyck H, et al. The effect of pore geometry on the in vitro biological behavior of human periosteum-derived cells seeded on selective laser-melted Ti6Al4V bone scaffolds. *Acta Biomater.* 2012;8:2824–34.
191. Li X, Wang C-T, Zhang W-G, Li Y-C. Properties of a porous Ti-6Al-4V implant with a low stiffness for biomedical application. *Proc. Inst. Mech. Eng. [H].* 2009;223:173–8.
192. Bose S, Avila M, Bandyopadhyay A. Processing of Bioceramic Implants via Fused Deposition Process. 9th Solid Free. Fabr. Symp. 1998;629–36.
193. Zein I, Hutmacher DW, Tan KC, Teoh SH. Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications. *Biomaterials.* 2002;23:1169–85.
194. Kupp D, Eifert H, Greul M, Kunstner M. Rapid prototyping of functional metal and ceramic components by the multiphase jet solidification (MJS) process. *Proceedings of the Solid Freeform Fabrication Symposium.* Austin, Texas; 1997.
195. Ang T, Sultana F, Hutmacher DW, Wong Y, Fuh J, Mo X, et al. Fabrication of 3D chitosan–hydroxyapatite scaffolds using a robotic dispensing system. *Mater. Sci. Eng.* 2002;20:35–42.
196. Dellinger J, Cesarano J, Jamison R. Robotic deposition of model hydroxyapatite scaffolds with multiple architectures and multiscale porosity for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res.* 2007;82A:383–94.
197. Kim SS, Utsunomiya H, Koski JA, Wu BM, Cima MJ, Sohn J, et al. Survival and Function of Hepatocytes on a Novel Three-Dimensional Synthetic Biodegradable Polymer Scaffold With an Intrinsic Network of Channels. *Ann. Surg.* 1998;228:8–13.
198. Detsch R, Schaefer S, Deisinger U, Ziegler G, Seitz H, Leukers B. In vitro: osteoclastic activity studies on surfaces of 3D printed calcium phosphate scaffolds. *J. Biomater. Appl.* 2011;26:359–80.
199. Warnke PH, Seitz H, Warnke F, Becker ST, Sivananthan S, Sherry E, et al. Ceramic scaffolds produced by computer-assisted 3D printing and sintering: characterization and biocompatibility investigations. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2010;93:212–7.
200. Lee JW, Ahn G, Kim JY, Cho D-W. Evaluating cell proliferation based on internal pore size and 3D scaffold architecture fabricated using solid freeform fabrication technology. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2010;21:3195–205.
201. Lee JW, Jung JH, Kim DS, Lim G, Cho D-W. Estimation of Cell Proliferation by Various Peptide Coating at the PPF/DEF 3D Scaffold. *Microelectron Eng.* 2009;86:1451–4.
202. Lee JW, Lan PX, Kim B, Lim G, Cho D-W. Fabrication and characteristic analysis of a poly(propylene fumarate) scaffold using micro-stereolithography technology. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2008;87:1–9.
203. Choi J, Wicker R, Lee S, Choi K, Ha C, Chung I. Fabrication of 3D biocompatible/biodegradable micro-scaffolds using dynamic mask projection microstereolithography. *J. Mater. Process. Technol.* 2009;209:5494–503.

204. Lee J, Ahn G, Kim D, Cho D. Development of nano- and microscale composite 3D scaffolds using PPF/DEF-HA and micro-stereolithography. *Microelectron. Eng.* 2009;86:1465–7.
205. Brie J, Chartier T, Chaput C, Delage C, Pradeau B, Caire F, et al. A new custom made bioceramic implant for the repair of large and complex craniofacial bone defects. *J. Cranio-Maxillofac. Surg.* 2013;41:403–7.
206. Man W, Megens M, Steinhardt PJ, Chaikin PM. Experimental measurement of the photonic properties of icosahedral quasicrystals. *Nature.* 2005;436:993–6.
207. Bertsch A, Jiguet S, Renaud P. Microfabrication of ceramic components by microstereolithography. *J. Micromechanics Microengineering.* 2004;14:197–203.
208. Lee J, Kang K, Lee S, Kim J, Lee B, Cho D. Bone regeneration using a microstereolithography-produced customized poly (propylene fumarate)/diethyl fumarate photopolymer 3D scaffold incorporating BMP-2 loaded PLGA microspheres. *Biomaterials.* 2011;740–8.
209. Leigh SJ, Gilbert HTJ, Barker IA, Becker JM, Richardson SM, Hoyland JA, et al. Fabrication of 3-Dimensional Cellular Constructs via Microstereolithography Using a Simple, Three-Component, Poly(Ethylene Glycol) Acrylate-Based System. *Biomacromolecules.* 14:186–92.
210. Zhang X, Jiang X, Sun C. Micro-stereolithography of polymeric and ceramic microstructures. *Sens. Actuators.* 1999;77:149–56.
211. Lee D, Miyoshi T, Takaya Y, Ha T. 3D Microfabrication of Photosensitive Resin Reinforced with Ceramic Nanoparticles Using LCD Microstereolithography. *JLMN-J. Laser MicroNanoengineering.* 2006;1:142–8.
212. Duterte D, Baillargeat, Verdeyme, Chartier, Delhote N, Baillargeat D, Verdeyme S, Chartier T. 3D Ceramic Microstereolithography applied to sub-millimeter devices manufacturing. *Eur. Microsc. Symp. Munich Oct.* 2007. 2007;2007:1–4.
213. Miyamoto Y, Chen W, Kiriara S. Smart processing of 3D Micro Ceramic Devices by CAD/CAM Microstereolithography and sintering. *JWRI.* 2007;36.
214. Lee J, Lan P, Kim B, Lim G, Cho D. 3D scaffold fabrication with PPF/DEF using micro-stereolithography. *Microelectron. Eng.* 2007;84:1702–5.
215. Chartier T, Duterte C, Delhote N, Baillargeat D, Verdeyme S, Delage C, et al. Fabrication of Millimeter Wave Components Via Ceramic Stereo- and Microstereolithography Processes. *Am. Ceram. Soc.* 2008;91:2469–74.
216. Yang H, Ratchev S, Turitto M, Segal J. Rapid Manufacturing of Non-Assembly Complex Micro-Devices by Microstereolithography. *Tsinghua Sci. Technol.* 2009;14:164–7.
217. Seol Y-J, Park DY, Park JY, Kim SW, Park SJ, Cho D-W. A new method of fabricating robust freeform 3D ceramic scaffolds for bone tissue regeneration. *Biotechnol. Bioeng.* 2013;110:1444–55.

218. Raynaud S. Synthèse, frittage et propriétés mécaniques de phosphates de calcium dans le système hydroxyapatite-phosphate tricalcique [Thèse]. Université de Limoges; 1999.
219. Raynaud S, Champion E, Bernache-Assollant D, Thomas P. Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterisation and thermal stability of powders. *Biomaterials*. 2002;23:1065–72.
220. Elliott JC, editor. *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates*. Stud. Inorg. Chem. [Internet]. Elsevier; 1994 [cited 2015 Jan 4]. p. 111–89. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444815828500080>
221. Desport B, Carpena J, Lacout J-L, Borschneck D, Gattacceca J. Characterization of a calcium phospho-silicated apatite with iron oxide inclusions. *J Cryst Growth*. 2011;316:164–71.
222. Jacobs P. *Rapid prototyping and manufacturing: fundamentals of stereolithography*. Society of Manufacturing Engineers in cooperation with the Computer and Automated Systems Association of SME; 1992.
223. Jacobs P. *StereoLithography and Other RP&M Technologies: From Rapid Prototyping to Rapid Tooling*. Society of Manufacturing Engineers; 1996.
224. Chartier T, Chaput C, Doreau F, Loiseau M. Stereolithography of structural complex ceramic parts. *J. Mater. Sci*. 2002;37:3141–7.
225. Sun C, Zhang X. The influences of the material properties on ceramic micro-stereolithography. *Sens. Actuators*. 2002;A 101:364–70.
226. Griffith M, Halloran JW. Freeform fabrication of Ceramics via stereolithography. *J Am Ceram. Soc*. 1996;79:2601–8.
227. Hinczewski C, Corbel S, Chartier T. Ceramic Suspensions Suitable for Stereolithography. *J. Eur. Ceram. Soc*. 1998;18:583–90.
228. Jang J, Wang S, Pilgrim S, Schulze W. Preparation and characterization of Barium Titanate Suspensions for Stereolithography. *J Am Ceram. Soc*. 2000;83:1804–6.
229. Jiang XN, Sun C, Zhang X, Xu B, Ye YH. Microstereolithography of lead zirconate titanate thick film on silicon substrate. *Sens. Actuators Phys*. 2000;87:72–7.
230. Greco A, Licciulli A, Maffezzoli A. Stereolithography of ceramic suspensions. *J. Mater. Sci*. 2001;36:99–105.
231. Dufaud O, Corbel S. Stereolithography of PZT ceramic suspensions. *Rapid Prototyp. J*. 2002;8:83–90.
232. Chartier T, Duterte C, Abelard P, Abouliatim Y, Delage C, Chaput C. Net-shape forming of complex ceramic parts with a high dimensional resolution stereo- and microstereolithography. 10th Int. Conf. Exhib. Eur. Ceram. Soc. Berl. Allem. 2007.
233. Wozniak M, Graule T, De Hazan Y, Kata D, Lis J. Highly loaded UV curable nanosilica dispersions for rapid prototyping applications. *J. Eur. Ceram. Soc*. 2009;29:2259–65.

234. Tomeckova V, Halloran JW. Predictive models for the photopolymerization of ceramic suspensions. *J. Eur. Ceram. Soc.* 2010;30:2833–40.
235. Tomeckova V, Halloran JW. Cure depth for photopolymerization of ceramic suspensions. *J. Eur. Ceram. Soc.* 2010;30:3023–33.
236. Tomeckova V, Halloran JW. Critical energy for photopolymerization of ceramic suspensions in acrylate monomers. *J. Eur. Ceram. Soc.* 2010;30:3273–82.
237. Badev A, Abouliatim Y, Chartier T, Lecamp L, Lebaudy P, Chaput C, et al. Photopolymerization kinetics of a polyether acrylate in the presence of ceramic fillers used in stereolithography. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 222:117–22.
238. Chartier T, Badev A, Abouliatim Y, Lebaudy P, Lecamp L. Stereolithography process: Influence of the rheology of silica suspensions and of the medium on polymerization kinetics - Cured depth and width. *J. Eur. Ceram. Soc.* 32:1625–34.
239. Licciulli A, Esposito Corcione C, Greco A, Amicarelli V, Maffezzoli A. Laser stereolithography of ZrO₂ toughened Al₂O₃. *J. Eur. Ceram. Soc.* 2005;25:1581–9.
240. Lee K, Wang S, Fox B, Ritman E, Yaszemski MJ, Lu L. Poly(propylene fumarate) Bone Tissue Engineering Scaffold Fabrication Using Stereolithography: Effects of Resin Formulations and Laser Parameters. *Biomacromolecules.* 2007;8:1077–84.
241. Dellinger J, Wojtowicz A, Jamison R. Effects of degradation and porosity on the load bearing properties of model hydroxyapatite bone scaffolds. *J Biomed Mater Res.* 2006;77A:563–71.
242. Landi E, Valentini F, Tampieri A. Porous hydroxyapatite/gelatine scaffolds with ice-designed channel-like porosity for biomedical applications. *Acta Biomater.* 2008;4:1620–6.
243. Descamps M, Hornez J, Leriche A. Manufacture of hydroxyapatite beads for medical applications. *J. Eur. Ceram. Soc.* 2008;29:369–75.
244. Michna S, Wu W, Lewis J. Concentrated hydroxyapatite inks for direct-write assembly of 3-D periodic scaffolds. *Biomaterials.* 2005;26:5632–9.
245. Miranda P, Pajares A, Saiz E, Tomsia A, Guiberteau F. Mechanical properties of calcium phosphate scaffolds fabricated by robocasting. *Inc J Biomed Mater Res.* 2008;85A:218–27.
246. Saiz E, Gremillard L, Menendez G, Miranda P, Gryn K, Tomsia A. Preparation of porous hydroxyapatite scaffolds. *Mater. Sci. Eng.* 2007;C 27:546–50.
247. Abouliatim Y, Chartier T, Abelard P, Chaput C, Delage C. Optical characterization of stereolithography alumina suspensions using the Kubelka-Munk model. *J. Eur. Ceram. Soc.* 2009;29:919–24.
248. Dufaud O, Le Gall H, Corbel S. Application of stereolithography to chemical engineering “From Macro to Micro.” *Chem. Eng. Res. Des.* 2005;83(A2):133–8.

249. Lasgorceix M, Machado Costa A, Mavropoulos E, Sader M, Calasans M, Tanaka M, et al. In vitro and in vivo evaluation of silicated hydroxyapatite and impact of insulin adsorption. *J Mater Sci Mater Med*. 2014;(sous presse) DOI 10.1007/s10856-014-5237-x.
250. Liu W, Johnson S, Micic M, Orbulescu J, Whyte J, Garcia AR, et al. Study of the Aggregation of Human Insulin Langmuir Monolayer. *Langmuir*. 28:3369–77.
251. Jorgensen L, Bennedsen P, Hoffmann S, Krogh RL, Pinholt C, Groenning M, et al. Adsorption of insulin with varying self-association profiles to a solid Teflon surface - Influence on protein structure, fibrillation tendency and thermal stability. *Eur. J. Pharm. Sci*. 42:509–16.
252. Deng H-P, Chai J-K. The effects and mechanisms of insulin on systemic inflammatory response and immune cells in severe trauma, burn injury, and sepsis. *Int. Immunopharmacol*. 2009;9:1251–9.
253. Dandona P, Chaudhuri A, Ghanim H, Mohanty P. Insulin as an anti-inflammatory and antiatherogenic modulator. *J. Am. Coll. Cardiol*. 2009;53:S14–20.
254. Yang J, Zhang X, Wang W, Liu J. Insulin stimulates osteoblast proliferation and differentiation through ERK and PI3K in MG-63 cells. *Cell Biochem. Funct*. 2010;28:334–41.
255. Li S-H, Guo D-Z, Li B, Yin H-B, Li J-K, Xiang J-M, et al. The stimulatory effect of insulin-like growth factor-1 on the proliferation, differentiation, and mineralisation of osteoblastic cells from Holstein cattle. *Vet. J. Lond. Engl*. 1997. 2009;179:430–6.
256. Capilla E, Teles-García A, Acerete L, Navarro I, Gutiérrez J. Insulin and IGF-I effects on the proliferation of an osteoblast primary culture from sea bream (*Sparus aurata*). *Gen. Comp. Endocrinol*. 2011;172:107–14.
257. Gandhi A, Beam HA, O'Connor JP, Parsons JR, Lin SS. The effects of local insulin delivery on diabetic fracture healing. *Bone*. 2005;37:482–90.
258. Morçöl T, Nagappan P, Nerenbaum L, Mitchell A, Bell SJD. Calcium phosphate-PEG-insulin-casein (CAPIC) particles as oral delivery systems for insulin. *Int. J. Pharm*. 2004;277:91–7.
259. Ramachandran R, Paul W, Sharma CP. Synthesis and characterization of PEGylated calcium phosphate nanoparticles for oral insulin delivery. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater*. 2009;88:41–8.
260. Greenfield NJ. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat Protoc*. 2007;1:2876–90.
261. Paul W, Sharma CP. Tricalcium phosphate delayed release formulation for oral delivery of insulin: a proof-of-concept study. *J. Pharm. Sci*. 2008;97:875–82.
262. Billsten P, Wahlgren M, Arnebrant T, McGuire J, Elwing H. Structural Changes of T4 Lysozyme upon Adsorption to Silica Nanoparticles Measured by Circular Dichroism. *J. Colloid Interface Sci*. 1995;175:77–82.

263. Elsayed A, Al-Remawi M, Maghrabi I, Hamaidi M, Jaber N. Development of insulin loaded mesoporous silica injectable particles layered by chitosan as a controlled release delivery system. *Int. J. Pharm.* 2014;461:448–58.
264. Barth A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 2007;1767:1073–101.
265. Souillac PO, Middaugh CR, Rytting JH. Investigation of protein/carbohydrate interactions in the dried state. 2. Diffuse reflectance FTIR studies. *Int. J. Pharm.* 2002;235:207–18.
266. Dai W-G, Dong LC. Characterization of physiochemical and biological properties of an insulin/lauryl sulfate complex formed by hydrophobic ion pairing. *Int. J. Pharm.* 2007;336:58–66.
267. Van de Weert M, Haris PI, Hennink WE, Crommelin DJ. Fourier transform infrared spectrometric analysis of protein conformation: effect of sampling method and stress factors. *Anal. Biochem.* 2001;297:160–9.
268. Kondo, Mihara. Comparison of Adsorption and Conformation of Hemoglobin and Myoglobin on Various Inorganic Ultrafine Particles. *J. Colloid Interface Sci.* 1996;177:214–21.
269. Giacomelli CE, Norde W. The Adsorption–Desorption Cycle. Reversibility of the BSA–Silica System. *J. Colloid Interface Sci.* 2001;233:234–40.
270. Iafisco M, Sabatino P, Lesci IG, Prat M, Rimondini L, Roveri N. Conformational modifications of serum albumins adsorbed on different kinds of biomimetic hydroxyapatite nanocrystals. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2010;81:274–84.
271. Geiger B, Bershadsky A. Assembly and mechanosensory function of focal contacts. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2001;13:584–92.
272. Mussel RLDO, De Sá Silva E, Costa AMA, Mandarim-De-Lacerda CA. Mast cells in tissue response to dentistry materials: an adhesive resin, a calcium hydroxide and a glass ionomer cement. *J. Cell. Mol. Med.* 2003;7:171–8.
273. Rezzani R, Rodella L, Tartaglia GM, Paganelli C, Sapelli P, Bianchi R. Mast cells and the inflammatory response to different implanted biomaterials. *Arch. Histol. Cytol.* 2004;67:211–7.
274. Rey C, Collins B, Goehl T, Dickson IR, Glimcher MJ. The carbonate environment in bone mineral: a resolution-enhanced Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study. *Calcif. Tissue Int.* 1989;45:157–64.
275. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1995;11:73–91.

Annexes

Annexe I – Fiches de spécification

SIGMA-ALDRICH®

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

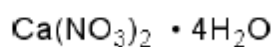
Email USA: techserv@sigmaaldrich.com

Outside USA: eurtechserv@sigmaaldrich.com

Product Specification

Product Name:
Calcium nitrate tetrahydrate – ACS reagent, 99%

Product Number: 237124
CAS Number: 13477-34-4
MDL: MFCD00149604
Formula: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
Formula Weight: 236.15 g/mol



TEST	Specification
Appearance (Color)	White
Appearance (Form)	Conforms to Requirements
Granular Powder or Crystals or Flakes	
Complexometric EDTA	99.0 - 103.0 %
X-Ray Diffraction	Conforms to Structure
Magnesium (Mg)	< 0.05 %
Potassium (K)	< 0.005 %
Sodium (Na)	< 0.01 %
Strontium (Sr)	< 0.05 %
pH	5.0 - 7.0
c = 5%, Water, 25 Deg C	
Heavy Metal	< 5.0 ppm
as Pb	
Iron (Fe)	< 5.0 ppm
Insoluble matter	< 0.005 %
c = 10%, Water	
Chloride Content	< 0.005 %
Nitrite	< 0.001 %
Sulfate	< 0.002 %
Barium	< 0.005 %
Meets ACS Requirements	Current ACS Specification
Tenth Edition	
Recommended Retest Period	
3 Years	

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.



Specification Sheet

Product: di-Ammonium hydrogen
orthophosphate

Code: A/5360/60

Grade: AR

Application:

Expiry Phrase:

Test	Guaranteed	Units
Assay	≥ 98	%
Calcium (Ca)	≤ 5	ppm
Copper (Cu)	≤ 5	ppm
Iron (Fe)	≤ 5	ppm
Lead (Pb)	≤ 5	ppm
Magnesium (Mg)	≤ 5	ppm
Nitrate (NO ₃) (%)	≤ 0.001	%
Potassium (K)	≤ 10	ppm
Sodium (Na)	≤ 10	ppm
Total chloride (Cl)	≤ 0.0005	%
Total silicon (Si)	≤ 50	ppm
Total sulfur (S)	≤ 50	ppm
Zinc (Zn)	≤ 5	ppm
pH (5% aq. solution)	≥ 7.8 and ≤ 8.2	

Additional Information:

Mrs K S Cluskey BSc
Quality & Compliance Manager.

Wednesday 30th of April 2014 01:44:54 PM
Any queries please phone: +44(0)1509 555158.

ThermoFisher
SCIENTIFIC

The world leader in serving science

Specification Sheet

SIGMA-ALDRICH®

Product Name	Silicon tetraacetate, 98%
Product Number	345156
Product Brand	ALDRICH
CAS Number	562-90-3
Molecular Weight	264.26
Storage Temp	−20°C

TEST

Appearance (Color)

Appearance (Form)

Infrared spectrum

Purity (GC)

SPECIFICATION

Conforms to Requirements

White to Beige

Conforms to Requirements

Crystals or Crystalline Powder

Conforms to Structure

≥97.5 %

Specification Sheet

Product: Ammonia solution 0.88 SG

Code: A/3280/21

Grade: AR

Application: For analysis

Expiry Phrase: Use within 5yrs of opening

Test	Guaranteed	Units
Assay	≥ 32 and ≤ 36	%
Calcium (Ca)	≤ 1	ppm
Carbonate (CO ₃)	≤ 0.002	%
Colour	≤ 10	APHA
Copper (Cu)	≤ 0.05	ppm
Iron (Fe)	≤ 0.2	ppm
Lead (Pb)	≤ 0.05	ppm
Magnesium (Mg)	≤ 0.1	ppm
Potassium (K)	≤ 1	ppm
Pyridine & homologues (C ₆ H ₅ N)	≤ 2	ppm
SG at 20C	≥ 0.88 and ≤ 0.89	
Sodium (Na)	≤ 5	ppm
Substances reducing KMnO ₄	≤ 0.001	%
Total chloride (Cl)	≤ 0.00005	%
Total phosphorus (P)	≤ 0.5	ppm
Total silicon (Si)	≤ 1	ppm
Total sulfur (S)	≤ 1	ppm
Zinc (Zn)	≤ 0.2	ppm

Additional Information:



Mrs K S Cluskey BSc
Quality & Compliance Manager.

Sunday 25th of May 2014 10:38:09 AM
Any queries please phone: +44(0)1509 555158.

Annexe II – Caractérisations structurales

II.1 Diffraction des rayons X

La diffraction des rayons X permet l'analyse des phases cristallines présentes au sein des poudres et des échantillons massifs. Les diffractogrammes sont acquis, sur un diffractomètre $\theta/2\theta$ Siemens D 5000, avec les radiations $K\alpha_1$ et $K\alpha_2$ du cuivre, sur l'intervalle en 2θ de 25° - 40° , avec un pas de $0,02^\circ$ et un temps de comptage par pas de 4s. La présence de doubles pics sur les diffractogrammes est due à la double radiation $K\alpha_1$ et $K\alpha_2$ du cuivre. Une radiation supplémentaire, engendrée par la présence d'un léger dépôt de tungstène sur le détecteur, induit des pics supplémentaires sur les diffractogrammes. En particulier, les pics à $30,4^\circ$, $30,8^\circ$ et $31,5^\circ$, observés sur certains diffractogrammes (exemple en Figure 17, p 74), correspondent à ceux de la phase apatitique pour la radiation du tungstène. Les phases sont identifiées par comparaison avec les fiches PDF (*Powder Diffraction File*) de la base de données ICDD (*International Center for Diffraction Data*). Les fiches PDF des composés synthétisés et des principaux produits de décomposition de ces composés sont répertoriées dans le Tableau 35.

Composé	Formule chimique	Fiche PDF
HA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	9 – 432
α -TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	9 – 348
β -TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	9 – 169
Chaux vive	CaO	37 – 1497
Phosphate tétracalcique	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	25 – 1137
Silicate de calcium	$\text{Ca}_2(\text{SiO}_4)$	86 – 401
Silicocarnotite	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_4(\text{SiO}_4)_2$	40 – 393

Tableau 35 : Fiches PDF de référence pour l'indexation des différents composés pouvant être détectés par DRX

II.2 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

Les mesures de spectrométrie infrarouge des poudres et des liquides sont réalisées à l'aide d'un spectromètre Perkin Elmer sur un intervalle de nombre d'onde allant de 400 à 4000 cm^{-1} avec une résolution de 2 cm^{-1} , par absorbance au travers de pastilles de bromure de potassium (KBr). Concernant les échantillons pulvérulents, les pastilles analysées sont mises en forme par pressage uniaxial d'un mélange homogène de poudre (environ 1 % massique) et de KBr (environ 99 % massique) dans un moule en acier inoxydable de 13 mm de diamètre. Dans certains cas, un taux de poudre plus important est choisi de façon à faire ressortir certaines bandes peu intenses quitte à saturer les bandes les plus intenses. Les échantillons liquides sont, quant à eux, déposés sous forme d'une goutte entre deux pastilles de KBr à l'aide d'une pipette pasteur. Une pastille de KBr pur est réalisée pour chaque série de mesure et analysée dans les mêmes conditions que les échantillons. Son spectre est ensuite soustrait à ceux des échantillons de façon à s'affranchir des contributions du KBr et des éventuels films de polymère présents sur l'équipement de mesure. Afin de pouvoir effectuer des comparaisons entre différents spectres, une normalisation [274] est effectuée en multipliant les valeurs d'absorbance par un coefficient ramenant l'absorbance de la bande $\nu_4\text{PO}_4$ (à 602 cm^{-1}) à 1, dans le cas des spectres ne comportant pas de saturation au niveau de cette bande.

Annexe III – Mesures de surface spécifique

La surface spécifique des poudres HA et SiHA est déterminée, au Laboratoire SPCTS, par la méthode BET 8 points à l'aide d'un équipement Micromeritics ASAP 2010. Les mesures sont effectuées sur environ $20 \pm 10 \text{ m}^2$ de poudre c'est-à-dire environ 0,5 g pour les poudres brutes, 1 g pour les poudres calcinées à 650 ou 700°C, 2 g pour les poudres calcinées à 1000°C et pour des poudres attritées et 3 g pour les poudres calcinées à 1200°C. Les échantillons de poudre sont pesés à l'aide d'une balance de précision à 10^{-4} g. Les isothermes d'adsorption de diazote sont réalisées à 77 K sur les poudres ayant subi un dégazage préliminaire à 250°C pendant environ 15 h. La valeur de surface spécifique des poudres est déduite de ces isothermes. L'erreur sur la mesure est de $0,3 \text{ m}^2/\text{g}$.

La surface spécifique des échantillons frittés est déterminée, à Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, par la méthode BET 5 points à l'aide d'un équipement ASAP 2020 V4.01 (V4.01 H). Chaque mesure est effectuée avec deux échantillons d'environ 60 mg chacun, ayant subi le même cycle thermique. Les échantillons sont pesés à l'aide d'une balance de précision à 10^{-4} g. Les isothermes d'adsorption de krypton sont réalisées à 77 K sur les échantillons ayant subi un dégazage préliminaire à 200°C, pendant 18 à 24 h.

Annexe IV – Mesures de densité

IV.1 Pycnométrie à Hélium

La masse volumique des poudres est mesurée par pycnométrie à hélium à l'aide d'un pycnomètre Micromeritics Acrylic II 1340. Les échantillons de poudre sont pesés à l'aide d'une balance de précision à 10^{-4} g. Pour chaque échantillon, la masse volumique est déterminée en moyennant les résultats de 10 mesures successives. L'erreur sur la mesure est de $0,05 \text{ g.cm}^{-3}$.

IV.2 Méthode d'Archimède

La densité volumique apparente des échantillons massifs frittés est déterminée par la méthode d'Archimède. Après 24 h de séchage à l'étuve à 100°C , les échantillons secs sont pesés à l'aide d'une balance Sartorius de précision 10^{-4} g. La masse sèche ainsi obtenue est notée $m_{\text{sèche}}$. Les échantillons sont ensuite placés dans une cloche à vide. L'air y est pompé jusqu'à obtention d'une pression constante d'environ 22 mbar. Le pompage est alors maintenu pendant 1 h. De l'eau distillée est introduite dans la cloche de façon à immerger les échantillons. L'air est à nouveau pompé jusqu'à obtention d'une pression constante d'environ 22 mbar. Le pompage est maintenu pendant 30 minutes afin de favoriser la pénétration des pores ouverts par l'eau distillée. Les échantillons sont ensuite repesés dans une nacelle suspendue plongeant dans un bœcher d'eau distillée à la température T . Cette seconde masse est notée $m_{\text{immergée}}$. Enfin, les échantillons sont épongés avec un chiffon humidifié de façon à éviter le vidage des pores ouverts par capillarité. Les échantillons sont pesés une dernière fois. La troisième masse ainsi obtenue est notée m_{humide} .

La densité volumique apparente, notée d_{Archi} , est calculée selon l'Équation 19, connaissant la masse volumique (L) de l'eau distillée à la température T de l'essai.

$$d_{\text{Archi}} = \frac{m_{\text{sèche}}}{m_{\text{humide}} - m_{\text{immergée}}} \times L$$

Équation 19 : Calcul de la densité par la méthode d'Archimède

Le taux de densification (τ) des échantillons frittés est déterminé à partir de la densité mesurée par la méthode d'Archimède (d_{Arch}) et de la densité (D) théorique des poudres calcinées à 1000°C pendant 15 h, selon l'Équation 20. La valeur D , pour HA, est prise égale à 3,154 g/cm³ selon la fiche PDF n° 9-432. Celle de SiHA est prise égale à 3,119 g/cm³. Cette valeur a été déterminée par Palard *et al.* [82] à partir des affinements de paramètres de maille d'une poudre de même composition chimique que les SiHA synthétisées dans la présente étude. Le taux de porosité ouverte P_o , de porosité totale P_T et de porosité fermée P_F , exprimés en %, sont calculés à partir de l'Équation 21, l'Équation 22 et l'Équation 23, respectivement.

$$\tau(\%) = \frac{d_{\text{Arch}}}{D} \times 100$$

Équation 20 : Calcul du taux de densification des échantillons frittés, par la méthode d'Archimède

$$P_o(\%) = \frac{m_{\text{humide}} - m_{\text{sèche}}}{m_{\text{humide}} - m_{\text{immergée}}} \times 100$$

Équation 21 : Calcul du taux de porosité ouverte des échantillons frittés, par la méthode d'Archimède

$$P_T(\%) = 100 - \frac{d_{\text{Arch}}}{D} \times 100$$

Équation 22 : Calcul du taux de porosité totale des échantillons frittés, par la méthode d'Archimède

$$P_F(\%) = P_T(\%) - P_o(\%)$$

Équation 23 : Calcul du taux de porosité fermée des échantillons frittés, par la méthode d'Archimède

Annexe V – Caractérisations rhéologiques

Les mesures rhéologiques des solvants et des suspensions sont effectuées à l'aide d'un rhéomètre ARG2 avec une géométrie cône plan équipée d'un cône en acier inoxydable de diamètre 40 mm avec un angle de 2° . L'écart entre le cône et le plan est fixé à $800\text{ }\mu\text{m}$ pour les suspensions et $52\text{ }\mu\text{m}$ pour les solvants. Dans un premier temps, l'échantillon est déposé sur le plan, le cône est ensuite descendu afin d'atteindre l'écartement choisi et les débordements sont éliminés pour obtenir un alignement adéquat du cône et de l'échantillon (Figure 121). La procédure utilisée est composée de deux rampes continues, d'une durée de 60 s chacune, imposant une variation linéaire du taux de cisaillement $\dot{\gamma}$ de 0 à 160 s^{-1} pour la première et de 160 à 0 s^{-1} pour la seconde, avec un pas de 1 s/point . La température du plan est maintenue à 25°C durant toute la durée de la mesure, à l'aide d'une circulation d'eau au sein du plan contrôlée par un bain thermostaté. Les deux paramètres mesurés sont la contrainte de cisaillement τ et la viscosité η . Les valeurs obtenues sont reportées en fonction des taux de cisaillement $\dot{\gamma}$ appliqués afin d'établir les rhéogrammes et les courbes d'écoulement.

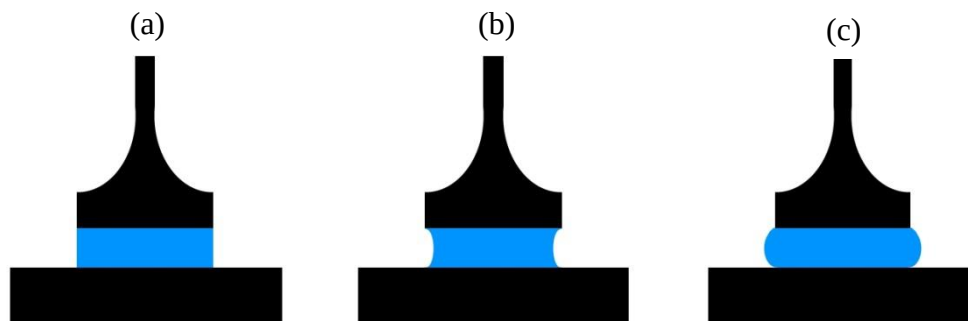


Figure 121 : Alignement de l'échantillon au cône : alignement adéquat (a), échantillon insuffisant (b), débordement (c)

Annexe VI – Analyses thermiques

VI.1 Analyses thermogravimétriques

Les courbes d'analyse thermogravimétrique (ATG) et le signal de calorimétrie différentielle (DSC, *Differential Scanning Calorimetry*) sont acquis simultanément à l'aide d'un équipement STA 449 F3 (Netzsch). Quelques dizaines de mg d'échantillons, pulvérulents ou massifs, sont placés dans des creusets en platine. Les analyses sont effectuées sous air, avec une montée en température de 30°C à 1000°C sans palier, et avec un pas d'acquisition de 4 pt/°C. La rampe de montée en température est fixée à 5°C/min ou à 10°C/min selon les cas.

VI.2 Dilatométrie

Le frittage des échantillons mis en forme par microstéréolithographie est suivi sur un dilatomètre horizontal (Netzsch DIL 402C). La variation d'épaisseur des échantillons est mesurée par le déplacement d'un palpeur en alumine appliquant une charge de 30 cN sur l'échantillon. Un flux d'air de 100 mL/min est maintenu durant la totalité du cycle thermique. Une correction est apportée afin de retirer la contribution de la dilatation de l'alumine pour obtenir les variations de l'échantillon uniquement.

Annexe VII – Granulométrie laser

La distribution granulométrique des poudres HA et/ou SiHA est déterminée par granulométrie laser à l'aide d'un équipement Horiba LA950V2 pourvu d'une source LD de 655 nm et une source LED de 405 nm. Le solvant utilisé est l'éthanol à 96 %. Le calcul est effectué avec des indices de réfraction de 1,63 et 1,36 pour la poudre et l'éthanol respectivement. Un échantillon de suspension poudre + éthanol, préalablement préparé et placée 15 min sur agitateur rotatif, est introduit progressivement dans le réservoir à l'aide d'une pipette pasteur jusqu'à obtention d'une transmission rouge comprise entre 80 et 90 % et une transmission bleue comprise entre 70 et 90 %. Les ultrasons sont activés au sein de la cuve du granulomètre pendant 5 min pour optimiser la dispersion. Un dégazage rapide de quelques secondes est ensuite effectué pour éliminer les éventuelles bulles d'air introduites pendant l'étape de dispersion aux ultrasons. L'élimination de la totalité des bulles d'air est contrôlée par l'observation du graphique d'acquisition en continu et le dégazage peut être renouvelé en cas de présence de bulles résiduelles. La mesure est ensuite activée sur 15 itérations. Une agitation et une circulation modérées sont maintenues avant introduction de l'échantillon et durant les étapes de dispersion, dégazage et mesure. Les distributions granulométriques sont obtenues en nombre ou en volume selon la sélection.

Annexe VIII – Microscopie électronique à balayage

La microstructure des échantillons est observée par microscopie électronique à balayage, à l'aide d'un microscope Philips XL30, avec une tension de 10 kV. Les échantillons polis subissent un gravage thermique préalable de quelques minutes, sous air, à une température inférieure de 20°C à leur température de frittage, dans un four Super Kanthal, avec une rampe de montée en température de 20°C/min. Les échantillons pulvérulents sont déposés sur un patch carbone conducteur. Les échantillons massifs sont collés sur le support à la laque d'argent. Deux ponts conducteurs en cuivre relient la surface de l'échantillon au support, pour les échantillons d'épaisseur supérieure à 1 mm. Concernant les échantillons d'épaisseur inférieure à 1 mm, la conduction est assurée par de la laque d'argent recouvrant la totalité de la tranche de l'échantillon. Enfin, les échantillons sur plots subissent une métallisation en platine de 15 nm d'épaisseur, avant d'être observés.

Annexe IX – Analyses statistiques

Les analyses statistiques des données issues des études *in vitro* et *in vivo* sont réalisées à l'aide du logiciel GraphPad InStat[®]. Le test de Student apparié est utilisé pour comparer les écarts moyens entre les groupes. Une valeur de p inférieure à 0,05 est considérée comme statistiquement significative.

Annexe X – Microscopie à force atomique

La topographie de surface des pastilles, avant et après polissage, est déterminée avec un microscope à force atomique (AFM) (Agilent Technologies), en mode contact avec une pointe en nitrure de silicium (17 kHz, 0,046 N.m⁻¹, AppNano, Hydra6V). Les acquisitions sont réalisées à l'aide du logiciel PicoView 1.8.2[®]. La rugosité moyenne de surface est évaluée de deux façons, avec les paramètres de hauteur Sq (hauteur quadratique moyenne de la surface) et Sa (hauteur arithmétique moyenne de la surface). Le plan de référence pour calculer ces deux paramètres est le plan moyen de la surface mesurée. Des profils linéaires sont issus des topographies de surface à l'aide du logiciel PicoImage[®]. Un exemple de profil issu d'une topographie de surface d'une pastille frittée et non polie d'HA est présenté en Figure 122. La rugosité moyenne du profil linéaire est évaluée de deux façons, avec les paramètres d'amplitude Rq (moyenne quadratique des écarts à la moyenne) et Ra (moyenne arithmétique des écarts à la moyenne). Les paramètres de hauteur Sq et Sa sont calculés selon la norme ISO 25178-2:2012 ¹¹. Les paramètres d'amplitude Rq et Ra sont calculés selon la norme ISO 4287:1997 ¹².

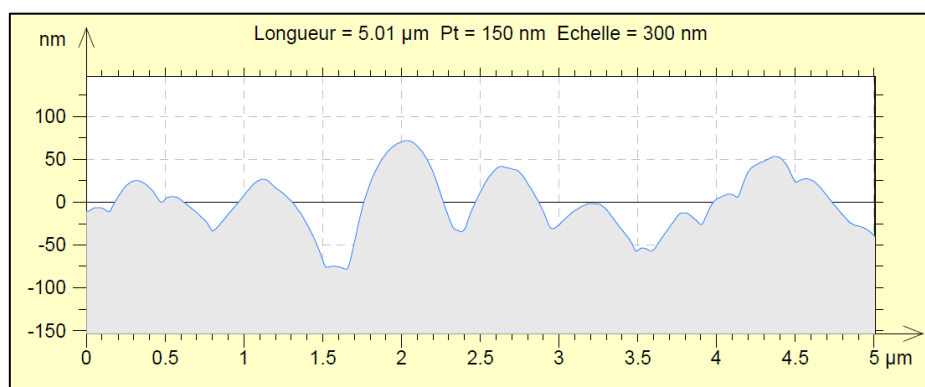


Figure 122 : Profil issu d'une topographie de surface d'une pastille frittée et non polie d'HA

¹¹ ISO 25178-2:2012 : Spécification géométrique des produits (GPS) – Etat de surface : Surfaique – Partie 2 : Termes, définitions et paramètres

¹² ISO 4287:1997 : Spécification géométrique des produits (GPS) – Etat de surface : Méthode du profil – Termes, définitions et paramètres

Annexe XI – Lexique

Angiogenèse : formation de nouveaux vaisseaux capillaires à partir de microvaisseaux sanguins existants par germination de cellules endothéliales [275].

Biodégradation : perte des propriétés physiques d'un matériau dans un environnement biologique.

Biodissolution : perte des propriétés chimiques d'un matériau dans un environnement biologique.

Biorésorption : biodégradation qui aboutit à la disparition du matériau, les produits de dégradation étant éliminés par voie rénale ou métabolisés.

Ostéoconduction : propriété passive d'un matériau à recevoir la repousse osseuse, par invasions vasculaire et cellulaire à partir du tissu osseux receveur, au contact de ce matériau.

Ostéoinduction : capacité d'induire une différenciation cellulaire pour synthétiser une matrice osseuse minéralisable.

Ostéogénèse : construction de la matrice osseuse par des cellules ostéoformatrices.

Hétérotopie : apparition anormale de tissus ou d'organes à des endroits du corps où ils ne devraient pas être.

Annexe XII – Nomenclature

2D : bidimensionnel
3D : tridimensionnel
3DP : *threedimensional printing* (impression tridimensionnel)
3DPlot : *threedimensional plotting* (tracé tridimensionnel)
ALP : phosphatase alcaline
AFM : microscopie à force atomique
ATG : analyse thermogravimétrique
BCP : phosphate de calcium biphasé
BET : Brunauer-Emmett-Teller
BMP : *bone morphogenetic protein*
CAM : membrane chorio-allantoïdienne
CAO : conception assistée par ordinateur
CaP : phosphate de calcium
CD : *circular dichroism* (dichroïsme circulaire)
DEF : diéthyl fumarate
DMSO : diméthylsulfoxyde
DRX : diffraction des rayons X
EBM : *electron beam melting* (fusion par faisceau d'électrons)
EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique
EP : ester phosphorique
FBS : fetal bovine serum (sérum de veau fœtal)
FDM : *fused deposition modeling* (dépôt de fil en fusion)
HA : hydroxyapatite
HDDA : 1,6-hexanediol diacrylate
IRTF : spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
LOM : *laminated object manufacturing* (découpe laser de feuillets)
MEB : microscopie électronique à balayage
MEC : matrice extracellulaire
MET : microscopie électronique en transmission
μSL : microstéréolithographie
MJS : *multiphase jet solidification* (solidification par jet multiphase)
PBS : *phosphate buffered saline* (tampon phosphate salin)
PDF : *powder diffraction file*
PDLLA : poly(D,L)-lactide
PEAAM : polyether acrylate à amine modifiée
PEG : polyethylene glycol
PFA : paraformaldéhyde
PI : photoinitiateur
PPF : polypropylène fumarate
ROD : *robotic dispensing* (distribution robotique)
SiHA : hydroxyapatite silicatée
SL : stéréolithographie
SBF : *simulated body fluid*
SFP : *solid foil polymerisation* (polymérisation de feuilles solides)
SLM : *selective laser melting* (fusion sélective par faisceau laser)

SLS : *selective laser sintering* (frittage laser sélectif)

TBS : *tris-buffered saline* (solution saline tamponnée au trishydroxyméthylaminométhane)

TCP : phosphate tricalcique

UV : ultra violet

Mots clefs : biocéramiques, microstéréolithographie, hydroxyapatite silicatée, macroporosité, microporosité, suspension, frittage, évaluation biologique, ingénierie des tissus osseux

Résumé

Des biocéramiques d'hydroxyapatite silicatée (SiHA) macro-micro-poreuses et d'architecture contrôlée ont été mises en forme par microstéréolithographie puis consolidées par frittage. Dans cette optique, des suspensions de particules SiHA, dispersées en milieu organique photoréactif, ont été développées. Leur comportement rhéologique a été étudié en fonction des taux de poudre, de diluant organique et de dispersant. Une formulation, permettant un bon compromis entre comportement rhéologique et réactivité de la suspension, définition et maintien mécanique des pièces macroporeuses mises en forme, a été retenue. Après optimisation des paramètres du procédé, l'étude de la surpolymérisation, en fonction des dimensions et des géométries des macropores, a conduit à un modèle prédictif de dimensionnement de ceux-ci, utilisé pour la conception assistée par ordinateur des pièces. Des échantillons modèles, contenant des macropores de différentes tailles (>300 µm) et de géométries variées, ont ensuite été confectionnés. L'influence de la température et de la durée du frittage, sur la microstructure des céramiques, a été précisée. Un taux de microporosité ouverte contrôlé sur une large gamme (jusqu'à 37 %) a pu être obtenu par ajustement de ces paramètres de frittage. L'amélioration de l'ostéointégration des substituts osseux passe par l'optimisation de leur architecture poreuse. Dans ce contexte, afin d'évaluer l'influence de la géométrie des macropores sur les phénomènes biologiques impliqués dans l'ostéogénèse, des études de prolifération de cellules osseuses *in vitro* et de vascularisation *ex vivo* ont été menées sur les substrats poreux de SiHA.

Key words: bioceramics, microstereolithography, silicated hydroxyapatite, macroporosity, microporosity, slurry, sintering, biological evaluation, osseous tissue engineering

Abstract

Macro-micro-porous bioceramics made of silicated hydroxyapatite (SiHA), with a controlled architecture, were shaped by microstereolithography and consolidated by sintering. For this purpose, slurries with SiHA particles, dispersed in organic photosensitive medium, were developed. Their rheological behaviour was studied according to the powder, organic diluent and dispersant amounts. A formulation, allowing a good compromise between rheological behaviour and reactivity of the suspension, definition and mechanical strength of the shaped macroporous parts, was chosen. After optimization of the process parameters, the study of the overcure, according to the dimensions and the geometry of the macropores, has led to a predictive sizing model of pores, used for the computer aided design of the parts. Model specimens, containing different pore sizes (> 300 µm) of several geometries, were then shaped. The influence of the sintering temperature and time, on the ceramic microstructure, was investigated. A controlled amount of open microporosity over a wide range (up to 37%) was obtained by adjusting these sintering parameters. Improving the osteointegration of osseous substitutes requires an optimization of their architecture. In this context, in order to assess the effect of the geometry of the macropores on the biological phenomena involved in osteogenesis, *in vitro* studies of bone cells proliferation and *ex vivo* studies of vascularization were performed on the SiHA porous substrates.